

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**“RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL TRANSFORMING
GROWTH FACTOR- β Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO
CON RADIOTERAPIA EN PACIENTES CON CARCINOMA
ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO”**

Trabajo de investigación por: María Martel Martín

Director: Xavier León Vintró

Barcelona, septiembre 2012

Palabras clave: TGF- β ; Carcinoma escamoso de cabeza y cuello; Radioterapia.

RESUMEN

En este estudio se determinó los niveles de expresión del gen TGF- β en muestras de 117 pacientes con CECC. El tejido tumoral contó con un nivel de expresión de TGF- β superior al correspondiente a las mucosas sanas. En el grupo de pacientes con unos niveles bajos de expresión del TGF- β (n=16, 13.7%) contaron con un control local de la enfermedad del 100%, y en el grupo de pacientes con unos niveles superiores al punto de corte (n=101, 86.3%), un 36.6% de los pacientes contaron con una recidiva del tumor a nivel local después de realizado el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Paraules clau: TGF- β ; Carcinoma escamós de cap i coll; Radioteràpia.

RESUM

En aquest estudi es van determinar els nivells d'expressió del gen TGF- β en una mostra de 117 pacients amb CECC. El teixit tumoral va presentar un nivell de TGF- β superior al corresponent en mucoses sanes. En el grup de pacients amb uns nivells d'expressió baixos de TGF- β (n=16, 13,7%) va haver-hi un control local de la malaltia del 100% i, en el grup de pacients amb uns nivells superiors al punt de tall (n=101, 86,3%), un 36,6% dels pacients van presentar recidiva del tumor a nivell local un con realitzat el tractament amb radioteràpia o quimiorradioteràpia.

CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

El Dr. Xavier León i Vintró, profesor titular de UAB, del Departamento de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HACE CONSTAR:

que el trabajo titulado “RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO” ha estado realizado bajo mi dirección por el licenciado María Martel Martín, encontrándose en las condiciones de poder ser presentado como trabajo de investigación de 12 créditos, dentro del programa de doctorado en Cirugía (curso 2011-2012), en la convocatoria de septiembre.

Barcelona, 2 de agosto de 2012

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA.....	6
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICAS	7
ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DEL TGF-β	8
PAPEL DEL TGF-β EN EL CÁNCER	8
PROCEDENCIA DEL TGF-β EN LOS TUMORES.....	11
ALTERACIONES DE LA VÍA TGF-β EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO Y SUS CONSECUENCIAS.....	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

INTRODUCCIÓN

La vía del transforming growth factor- β (TGF- β) cuenta con un papel destacado como promotor del crecimiento celular y la morfogénesis durante las fases de desarrollo embrionario, y de control de la proliferación e inducción de la apoptosis a medida que los tejidos maduran.

El TGF- β es una proteína que cuenta con al menos tres isoformas llamadas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. La familia de citoquinas TGF- β contiene dos subfamilias, la TGF- β /activina/nodal y la [bone morphogenetic protein](#) (BMP)/hormona anti-mülleriana (MIS)/factor de crecimiento y diferenciación (GDF).

La estructura peptídica de los tres miembros de la familia TGF- β es muy similar. Los tres son codificados como precursores: TGF- β 1 con 390 aminoácidos y TGF- β 2 y TGF- β 3 con 412 aminoácidos. Cuentan con un péptido de señal en la porción N-terminal compuesto por 20-30 aminoácidos necesarios para su secreción por parte de la célula, una pro-región denominada [latency associated peptide](#) (LAP), y una porción C-terminal que es la forma madura de la molécula, tras la liberación proteolítica del LAP. Una vez sintetizado y secretado, las forma inmaduras del TGF- β quedan secuestradas a nivel de la matriz extracelular hasta su activación, que puede ser inducida por la gran cantidad de mecanismos, incluyendo la expresión de $\alpha_v\beta_6$, integrinas, calpaina, catepsina D, quimasa, elastasa, endoglicosidasa F, calicreina, MMP-9, neuraminidasa, plasmina, trombospondina 1, o la presencia de radicales libres.

La forma madura del TGF- β dimeriza para formar la molécula activa. Los dímeros activados de TGF- β actúan sobre unos receptores específicos, los receptores TGF- β tipos I, II y III. Hasta el momento se han descrito hasta un total de siete formas del receptor tipo I (ALK-1 a ALK-7) y cinco del tipo II.

Los dímeros activos del TGF- β 1 y 3 se unen de forma preferencial a homodímeros del TGF- β RII. El ligando TGF- β 2 requiere de su unión al TGF- β RIII para su unión con el TGFR-II. Una vez unido con el ligando activo, TGF- β RII es capaz de transactivar los receptores tipo I, formando unos complejos de receptores heterotetrámicos activos.

La transactivación del TGF- β RI induce la señalización de la vía metabólica a partir de un mecanismo de activación canónico dependiente de Smad o a través de vías de activación alternativas.

Vía de señalización canónica

En mamíferos se han descrito ocho proteínas de la familia Smad divididas en tres grupos: Smads activadas por el receptor (R-Smad) que incluye las proteínas Smad1,2,3,5 y 8; Smad inhibidor, representado por Smad7; y el grupo Smad común o Smad4.

Tras la unión de TGF- β con TGF- β RII, se produce una fosforilación de TGF- β RI(ALK5), que a su vez fosforila R-Smads, preferentemente Smad2 y 3, que una vez activadas se asocian con Smad4. Se ha descrito además una activación de Smad1 y 5 a partir de la activación de TGF- β RI(ALK1). El complejo activado se trasloca hacia el núcleo donde interactúa con co-activadores y co-represores, induciendo o reprimiendo la expresión transcripcional de genes que quedan regulados por la actividad de la vía del TGF- β . Los complejos Smad-cofactores cuentan con una elevada afinidad y selectividad por la región promotora de los genes diana. El grupo de genes que son regulados simultáneamente a partir de la expresión de un complejo de Smad-cofactores de forma específica al tipo celular y el contexto biológico se denomina “grupo de sinexpresión”

Esta vía canónica queda a su vez regulada a través de múltiples mecanismos. El inhibidor Smad7 se localiza en el núcleo en estado basal, y se induce en respuesta a la actividad TGF- β , actuando como un mecanismo que regula la intensidad y duración de la respuesta de la señales Smad. Smad7 interactúa físicamente con TGF-RI ocluyendo el acceso a Smad 2-3, y recluta una ligasa (Smurf1/2) que facilita la ubiquitinación y degradación de los receptores TGF- β . Por su parte, la señal Smad 2-3 queda suprimida a partir de su desfosforilación e inactivación en el núcleo a partir de la acción de fosfatasas nucleares, y su poliubiquitinización y degradación por acción del proteosoma. Finalmente, la actividad de Smad4 queda regulada por la expresión de ectodermina/tif1gamma.

Vías de señalización no canónicas

Además de estimular la vía canónica a partir de la fosforilación de Smads, TGF- β también cuenta con la capacidad de modificar el comportamiento celular a través de vías de señalización independientes de Smad. La unión de los receptores de TGF- β con sus ligandos específicos activa vías como las MAP quinasas ERK1/ERK2, p38MAPK, JNK, AKT/PKB, Rho GTPasa, o mTOR, entre otras.

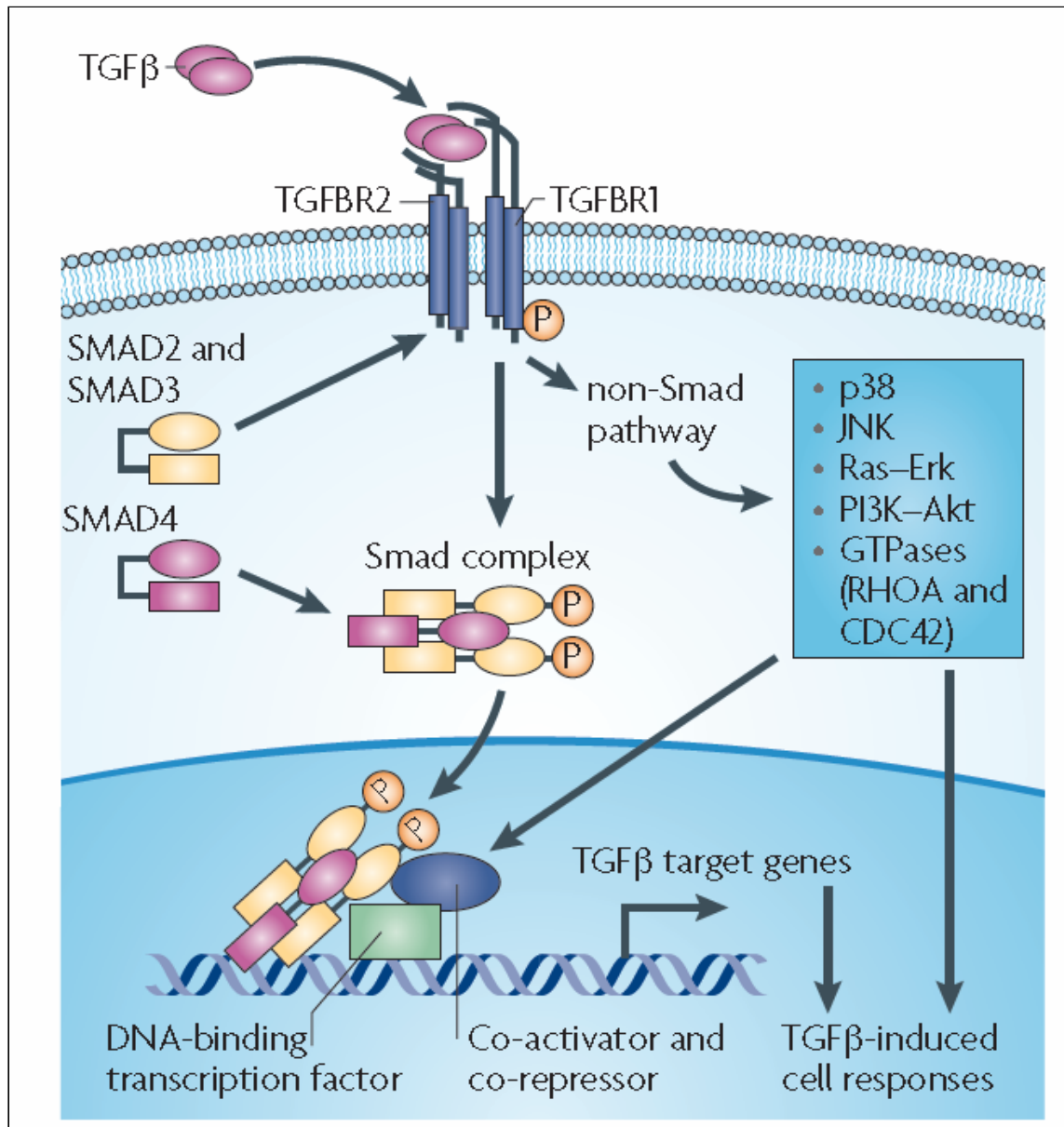


Figura 1. Vías de señalización canónica y no canónica

Actividad fisiológica del TGF- β

En los tejidos epiteliales, el TGF- β juega un papel importante en la regeneración y diferenciación celular. La mayor parte del TGF- β secretado por las células queda en la matriz extracelular en forma latente, y sólo una pequeña parte es activado, participando en los mecanismos de homeostasis. Ante una situación de daño tisular se produce una liberación abundante del TGF- β a partir de la actividad plaquetar y de células del estroma. Por un lado, la presencia de TGF- β induce una transformación de las células epiteliales, que adquieren características fibroblastoides y con un fenotipo móvil, con un incremento en la secreción de la matriz extracelular, lo que ayuda a la reparación del daño tisular. A la vez, la presencia del TGF- β comporta una regulación de la proliferación de los elementos celulares tanto epiteliales como mesenquimales con el objetivo de prevenir la proliferación celular excesiva, a la vez que regula los fenómenos inflamatorios. Los mecanismos a través de los cuales el TGF- β ejerce su actividad antiproliferativa incluyen la represión de la transcripción de factores promotores de la proliferación como c-Myc, o la inducción de inhibidores de las protein-quinasas dependiente de ciclina (CDK), como son p21 o p15. Igualmente, en un contexto fisiológico, el TGF- β induce la apoptosis celular a partir de mecanismos dependientes e independientes de la vía Smad.

Papel del TGF- β en el cáncer

La adquisición por parte de las células pre-neoplásicas de la habilidad de superar la represión a la proliferación celular inducida por el TGF- β es uno de los acontecimientos de mayor relevancia en el proceso de la carcinogénesis.

De acuerdo con Hanahan y Weinberg¹, las seis características biológicas adquiridas por las células tumorales a partir del proceso de la carcinogénesis incluyen la existencia de señales sostenidas de proliferación, la evasión de los mecanismos supresores de crecimiento, la resistencia a los fenómenos de inducción de muerte celular, la inmortalidad, la inducción de angiogénesis, y la capacidad de invasión y metástasis.

Los mecanismos de carcinogénesis transforman al TGF- β de un elemento con capacidad antitumoral en un potente promotor del tumor, con capacidad de

actuar en los diferentes elementos fenotípicos que caracterizan a la célula tumoral.

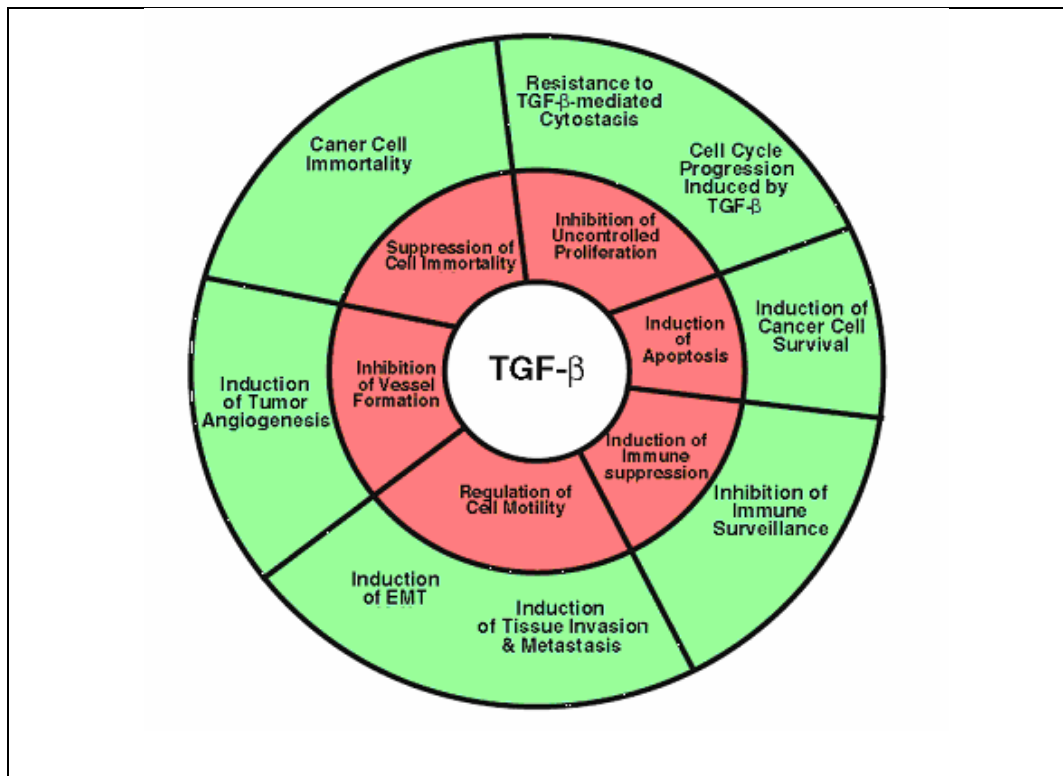


Figura 2. Características tumorales del TGF-β

- Regulación de la proliferación celular. Las células tumorales no sólo adquieren la habilidad de evadir la parada del ciclo celular inducida por el TGF-β en condiciones fisiológicas, si no que además cuentan con la capacidad de proliferar de forma activa a partir de la estimulación por el mismo TGFβ a partir de la activación de las vías Ras/MAP quinasa y la inducción en la expresión de citoquinas y factores de crecimiento como IL-1, PDGF o los receptores del PDGF o EGF.
- Transición epitelial-mesenquimal. Los mecanismos de transición epitelial-mesenquimal implican:
 - a) La pérdida de polaridad celular debida a una represión en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, integrinas).
 - b) Reorganización de la arquitectura del citoesqueleto y redistribución de las organelas intracelulares.

c) Sobreexpresión de los marcadores fibroblásticos (vicentina, N-cadherina, α -actina).

d) Incremento en la capacidad de invasión y migración celular.

A partir de este mecanismo de transición, las células epiteliales adquieren un fenotipo metastático y de resistencia a los tratamientos.

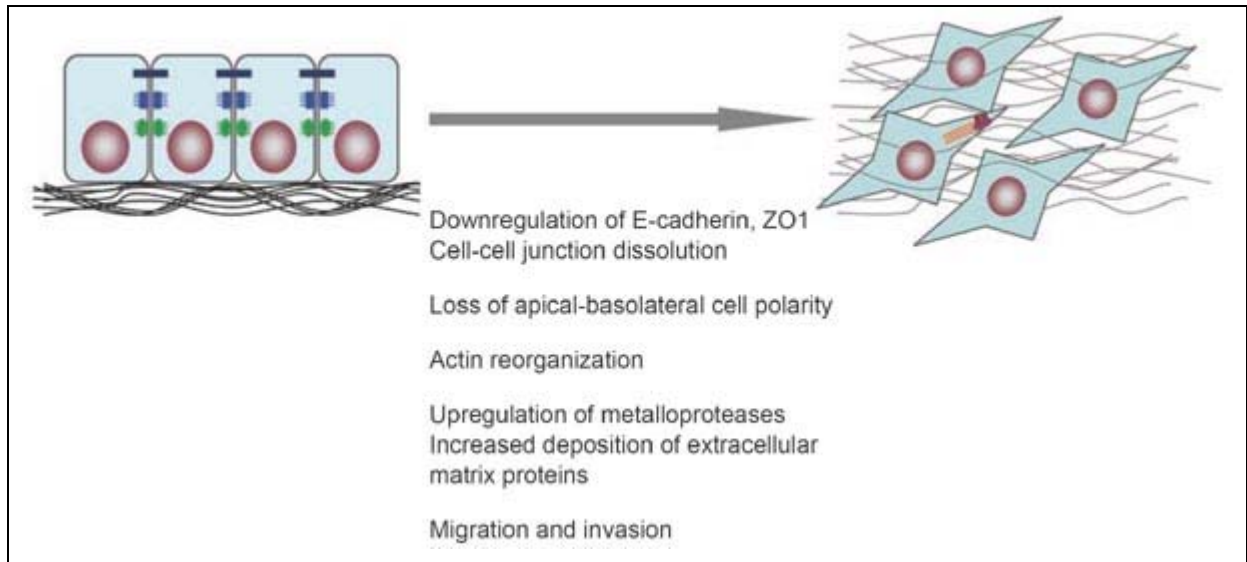


Figura 3. Mecanismos de transición epitelial-mesénquima

El TGF- β aparece como el elemento clave en la regulación de este mecanismo de transición epitelial-mesénquima. El TGF- β puede inducir la transición epitelial-mesénquima a partir de diferentes mecanismos mediados tanto por la vía canónica como por las vías alternativas.

- Angiogenesis. El mecanismo de angiogenesis comprende dos fases secuenciales de activación y resolución. El TGF- β cuenta con capacidad para regular ambas fases. La activación de TGF- β RI/ALK5 actúa de forma preferente promoviendo la fase de resolución, en tanto que la activación de TGF- β RI/ALK1 actúa sobre la fase de activación. La decisión de unirse al receptor ALK1 o ALK5 depende de la relación existente entre TGF- β y citoquinas angiogénicas.
- Regulación de la apoptosis. La alteración en la vía de señalización fisiológica del TGF- β inducida por los mecanismos de carcinogenesis conlleva el transformarlo de activador de la apoptosis en un promotor de la supervivencia celular. Esta alteración en el comportamiento celular justifica

la promoción de la viabilidad celular tras la administración de quimioterapia o radioterapia, que se ha asociado a la activación de las vías del NFκ-B o PI3/AKT por parte del TGF-β. La activación del TGF-β en células epiteliales normales conduce a una supresión de la actividad del NFκ-B a partir de la inducción del Iκ-B, mecanismo que queda inactivado durante el proceso de carcinogénesis. Por otro lado, en diferentes modelos tumorales, el estímulo con TGF-β conduce a la activación del NFκ-B, y el consecuente incremento de la agresividad tumoral correspondiente a la inducción de esta vía de señalización. Este incremento en la actividad NFκ-B corresponde a la estimulación de TAK1, que induce la activación de la IKK. Por otra parte, la inducción de la vía AKT y p38 MAPK pueden potenciar la activación de IKK y de la vía NFκ-B. La actividad NFκ-B juega un papel importante en la regulación por parte del TGF-β de la transición epitelial-mesenquimal y los fenómenos inflamatorios a nivel local.

- Regulación de la respuesta inmune. La activación del TGF-β promueve la quimiotaxis de células monocitarias, donde potencian los mecanismos oncogénicos al inducir la degradación de la matriz extracelular, promover los mecanismos de angiogenesis, y favorecer la inmunosupresión. Además, el TGF-β suprime la actividad citotóxica antitumoral de las células T, e inhibe las células NK, contribuyendo a la existencia de un microambiente permisivo a la progresión tumoral.

Procedencia del TGF-β en los tumores

El TGF-β aparece en el microambiente tumoral como un elemento que las células tumorales utilizan como una señal autocrina y paracrina que favorece los fenómenos de carcinogénesis. Las fuentes de TGF-β en los tumores son diversas, incluyendo las propias células tumorales, así como células presentes en el estroma tumoral, incluyendo la infiltración por leucocitos, macrófagos y precursores medulares de células endoteliales, mesenquimales y mieloides presentes en los frentes de infiltración tumoral, que coincide con las áreas de expresión del TGF-β.

El TGF- β es abundante en el microambiente tumoral como consecuencia de una sobreexpresión del ligando activo, en tanto que su respuesta fisiológica se ve alterada en base a la alteración o modificación de las vías de señalización. La manera como las células tumorales pueden obviar la actividad supresora de tumor ejercida en condiciones normales por parte del TGF- β es a partir de la decapitación de la vía de señalización canónica, con mutaciones inactivantes de los receptores o de sus mecanismos de transducción de señal, o mediante una supresión selectiva de las vías implicadas en los mecanismos de supresión del tumor.

Dasgupta y cols² realizaron una determinación mediante inmunohistoquímica de la actividad TGF- β 1 en un modelo ortotópico de carcinoma de cavidad oral. Pudieron evidenciar que una línea celular (SCCVII/SF) que no expresaba el TGF- β 1 en cultivo, inducía la secreción abundante de TGF- β 1 en el microambiente tumoral y en la zona de infiltración una vez implantado a nivel de la cavidad oral, con aparición de inmunopositividad en las células tumorales presentes en las metástasis ganglionares, y con un incremento progresivo a nivel sérico. Los resultados del estudio hacen suponer la existencia de mecanismos de interacción entre las células tumorales y las presentes en el microambiente tumoral que regulan la expresión del TGF- β 1.

Alteraciones de la vía TGF- β en los carcinomas de cabeza y cuello y sus consecuencias.

La expresión del TGF- β 1 se encuentra incrementada en un 80% de los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC), en tanto que existen evidencias de que las alteraciones en la vía de señalización canónica TGF- β /Smad contribuyen a la iniciación y progresión de los tumores epiteliales. Pring y cols³ llevaron a cabo un estudio en líneas celulares de CECC para evaluar la transducción de la vía TGF- β . Además de las alteraciones a nivel de receptor, la pérdida de Smad4 o la sobreexpresión de Smad7 serían responsables de las alteraciones en esta vía de señalización. De acuerdo con sus resultados, la función represora de la proliferación tumoral ejercida en funciones fisiológicas por la TGF- β 1 dependería de la transcripción del

complejo Smad3/4. Por otro lado, los autores encontraron que Smad2 podría contar con la posibilidad de inducir una respuesta funcional inducida por TGF- β 1 independiente de Smad4, y que esta señal fuese crítica en para favorecer el proceso de diseminación metastásica celular.

Cohen y cols⁴ evaluaron la relación existente entre TGF- β y NF-kB. Por un lado pudieron observar que la alteración en la expresión de las subunidades receptoras del TGF- β eran un hallazgo frecuente tanto en líneas celulares como en muestras de CECC obtenidas de pacientes, y como la atenuación de la actividad TGF- β se correspondía con un incremento en la expresión del NF-kB, de manera que la restauración de la señal TGF- β condujo a una inhibición de la expresión del NF-kB. La mutación en p53 podría estar en el origen de la alteración en la vía de señalización de TGF- β para un grupo de tumores, a partir de la pérdida en la expresión del TGF- β RII. La transfección del tipo salvaje de p53 en líneas celulares que contaban con p53 mutada y ausencia de expresión del TGF- β RII promovió la expresión de éste y de los genes regulados a partir de su expresión. Finalmente, a partir de un modelo tumoral murino de CECC con delección de TGF- β RII, los autores describieron como, de forma concomitante con la pérdida de la señalización TGF- β se produjo un incremento en la actividad nuclear de NF-kB (p65 y p50), así como de genes regulados a partir de la activación del NF-kB (IL-1 α , VEGF, CXCL1/GRO1).

A partir de los hallazgos obtenidos los autores proponen un modelo según el cual la supresión de la actividad TGF- β en el epitelio promovería la activación aberrante de la vía del NF-kB, promoviendo la aparición de un incremento de la actividad inflamatoria a nivel local y el desarrollo y progresión tumoral. La mutación de p53 podría ser un elemento desencadenante al actuar como represor de la expresión del TGF- β RII y contribuir a la inhibición de la vía TGF- β en un subgrupo de tumores.

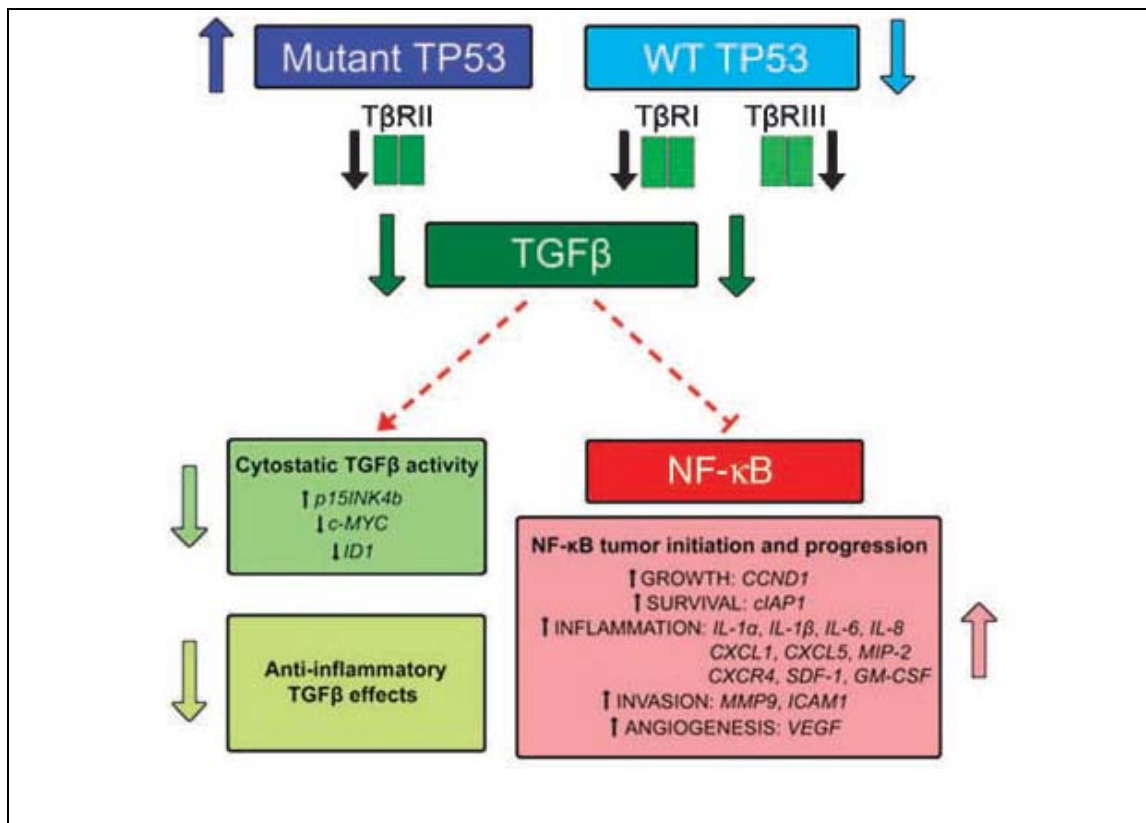


Figura 4. Supresión de la actividad TGF-β y activación aberrante de la vía del NF-κB

En un estudio desarrollado en 32 pacientes con CECC, Lu y cols⁵ encontraron que los niveles de TGF-β1 en muestras de tumor medidos mediante técnicas de ELISA eran significativamente superiores ($P < 0.01$) a los presentes en áreas de mucosa adyacentes al tumor, y a su vez, éstas contaron con unos niveles superiores a los correspondientes a muestras de mucosa obtenidas en sujetos control. La siguiente figura muestra los valores de concentración de TGF-β1 de las muestras control, de mucosa adyacente al tumor, y de las muestras de tumor.

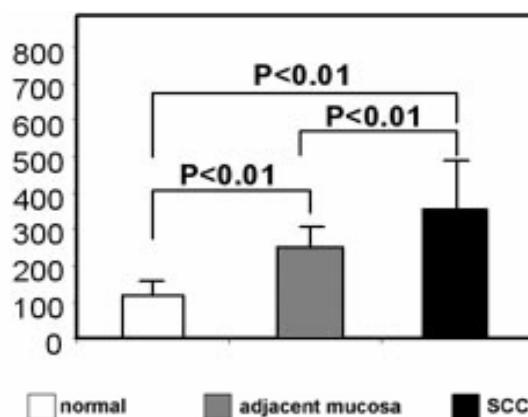


Figura 5. Valores de concentración de TGF-β1 de las muestras.

A partir de un modelo murino, los autores demostraron que la inducción transgénica sostenida del TGF- β 1 a nivel de las mucosas de cavidad oral comportó la aparición de alteraciones patológicas significativas, con una hiperplasia epitelial, incremento en la vascularización submucosa y un infiltrado inflamatorio severo, incluyendo una infiltración masiva de leucocitos a nivel del estroma. La siguiente figura muestra una tinción inmunohistoquímica de la forma activada de la proteína Smad2 en el modelo transgénico (H) respecto al control (G).

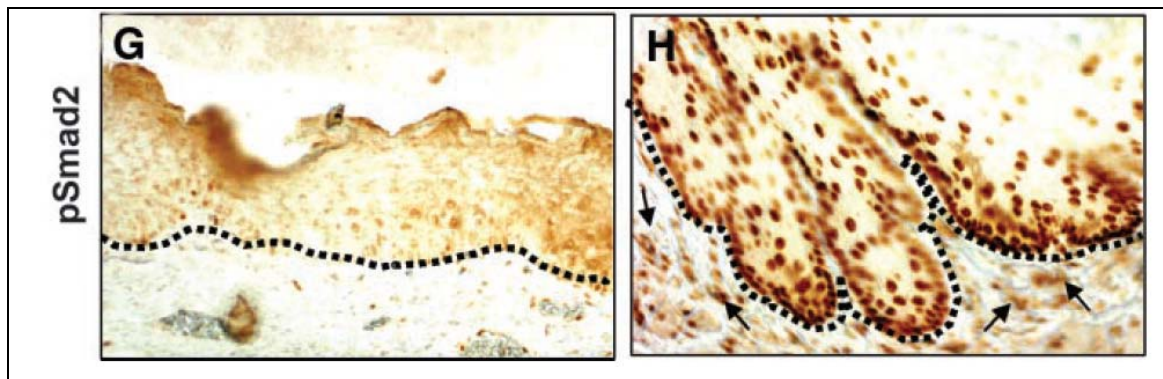


Figura 6. Tinción inmunohistoquímica de la forma activada de la proteína Smad2 en el modelo transgénico (H) respecto al control (G).

Los niveles de IL-1 β y TNF- α , dos citoquinas proinflamatorias, aparecieron significativamente incrementadas en la mucosa del modelo transgénico en relación al control, tal como aparece en la siguiente figura.

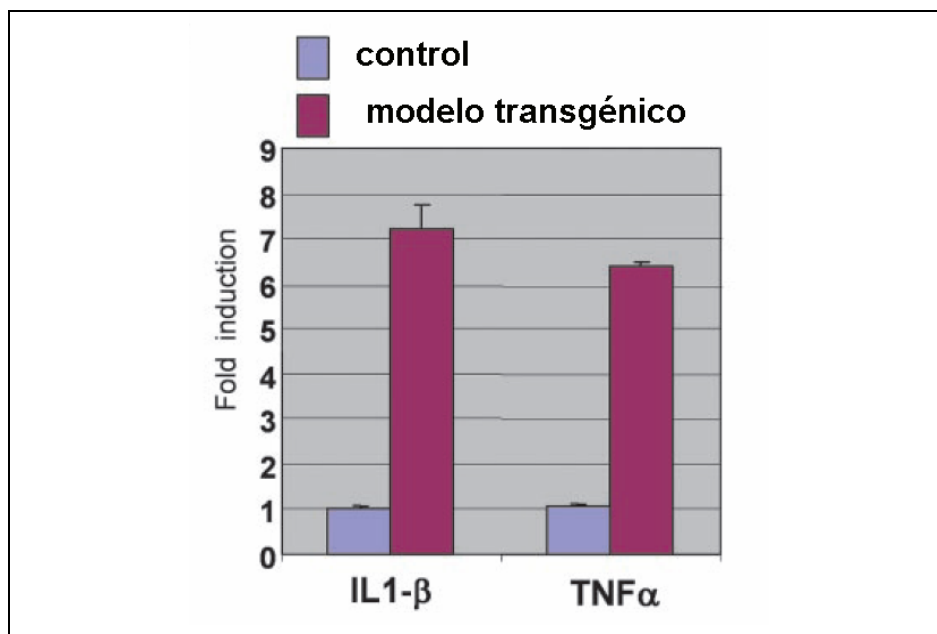


Figura 6. Niveles de IL-1 β y TNF- α

Además se pudo evidenciar la existencia de una traslocación nuclear de la subunidad p50, indicando la implicación de la vía del nuclear factor kappa-B (NFkB) en la respuesta inflamatoria inducida por el TGF- β 1.

Finalmente, los autores evaluaron los mecanismos responsables del incremento en la angiogénesis submucosa inducida por el TGF- β 1, encontrando que este efecto aparecía mediatizado a partir de la activación de Smad1-5 a través de ALK1.

En relación a la expresión de los TGF- β R, Muro-Cacho y cols⁶ llevaron a cabo una evaluación mediante técnicas de inmunohistoquímica de la actividad TGF β RI y TGF- β RII en una cohorte de 38 pacientes con CECC. No existieron diferencias en cuanto a la expresión del TGF- β TRI, en tanto que apareció una relación inversamente proporcional entre la expresión del TGF- β RII y el grado de diferenciación tumoral, existiendo una correlación entre los niveles de mRNA y la actividad inmunohistoquímica.

Lu y cols⁷ alcanzaron unos resultados similares, con una reducción significativa en los niveles de expresión del TGF- β RII en muestras de tumor correspondientes a 32 pacientes con CECC respecto a mucosa sana adyacente o a muestras de mucosa de pacientes no tumorales utilizadas como control. La reducción en la expresión del TGF- β RII apareció tanto a nivel inmunohistoquímico como a nivel transcripcional. Los niveles de mRNA correspondientes a las muestras de mucosa fueron de un $36\% \pm 11\%$ de los obtenidos en las muestras control. No existieron diferencias en la expresión del TGF- β RII entre las muestras control y la mucosa sana adyacente al tumor. La siguiente figura muestra los valores de mRNA correspondientes a la expresión del TGF- β RII.

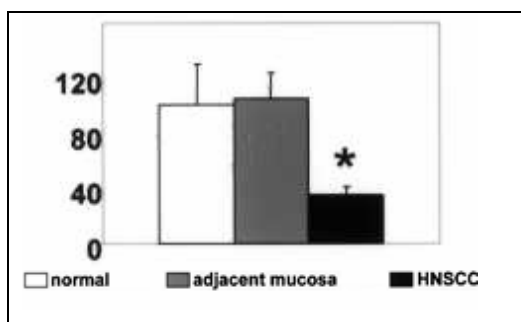


Figura 7. Valores de mRNA correspondientes a la expresión del TGF- β RII.

Los autores desarrollaron un modelo en ratones induciendo la delección del TGF- β RII de forma selectiva a nivel de las mucosas de cabeza y cuello. La ausencia de expresión del TGF- β RII no indujo cambios histológicos a nivel de la mucosa, lo que sugiere que no se trata de un elemento de iniciación tumoral. Por el contrario, la adición de mutaciones en K-ras o H-ras indujeron la aparición de carcinomas a nivel de las áreas de mucosa TGF- β RII^{-/-}. La ausencia de expresión del TGF- β RII indujo un incremento en los niveles de expresión de IL-1, MIP-2 (el análogo murino de la IL-8), SDF-1 y su receptor CXCR4. Igualmente, indujo un incremento en la expresión del TGF- β 1 tanto a nivel de la mucosa no tumoral TGF- β RII^{-/-} como de los carcinomas escamosos inducidos por la DMBA o por mutación K-ras desarrollados sobre la mucosa TGF- β RII^{-/-}, tal como muestra la siguiente figura.

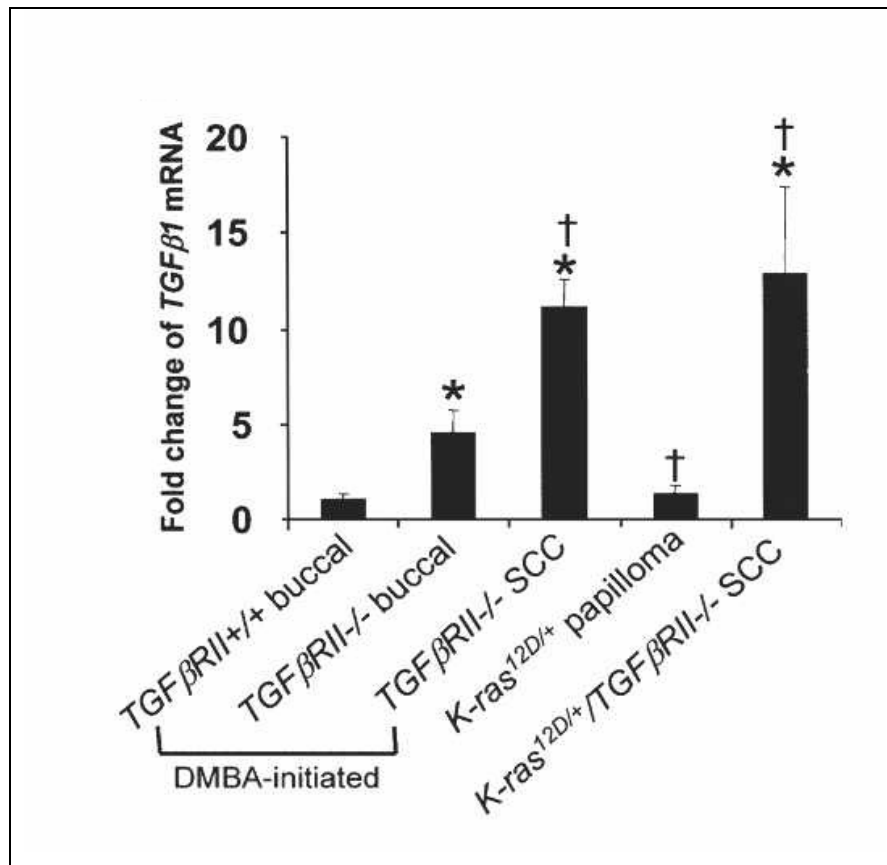


Figura 8. Incremento en la expresión del TGF- β 1

Mediante técnicas de microdissección los autores pudieron determinar que el incremento en la expresión del TGF- β 1 en respuesta a la delección del TGF- β RII aparecía tanto a nivel de las células epiteliales como del estroma, pero que el incremento fue superior en el componente estromal.

El mismo grupo de autores⁸ llevaron a cabo a continuación una evaluación del papel del Smad4 en el desarrollo de los CECC. La región 18q, donde se encuentra ubicado Smad4, es una diana frecuente de alteración genética en los CECC, habiéndose descrito pérdidas de heterocigosidad hasta en un 50% de casos⁹. Los autores analizaron muestras de tumor y mucosa sana adyacente de 36 pacientes con CECC, comparándolos con los datos obtenidos en mucosas sanas de pacientes no oncológicos. Un 86% de los tumores y un 67% de las mucosas adyacentes mostraron una reducción en los niveles de expresión del Smad4 medidos mediante RT-PCR superior al 50% respecto a la correspondiente a las mucosas control. La siguiente figura resume los hallazgos relativos a los niveles de Smad4 en función del tipo de tejido analizado.

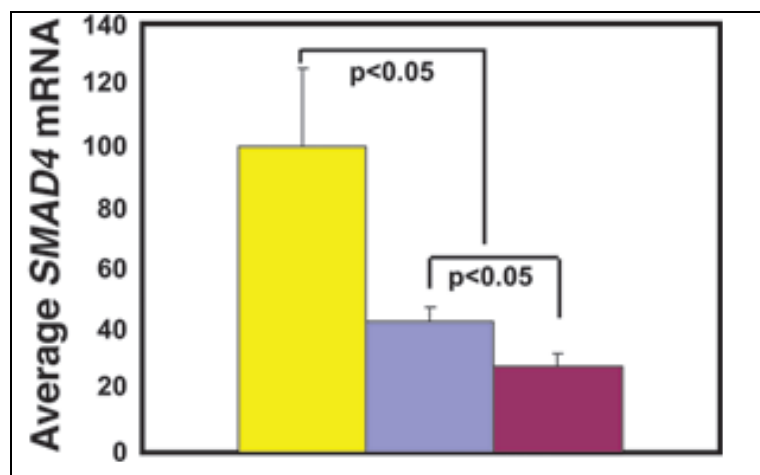


Figura 9. Niveles de Smad4

Un estudio inmunohistoquímico mostró una correspondencia entre los patrones de tinción y los niveles de expresión del mRNA.

A continuación, los autores desarrollaron un modelo experimental en el que se conseguía la delección a nivel de las mucosas de cabeza y cuello de forma específica de Smad4, lo que condujo a la aparición espontánea de carcinomas, de manera que a las 80 semanas de efectuada la delección el 74% de los animales Smad4^{-/-} habían desarrollado espontáneamente carcinomas a nivel de la cavidad oral. Por el contrario, ninguno de los ratones Smad4^{+/-} o Smad4^{+/+} presentó ningún tumor. Al evaluar los motivos por los cuales la pérdida de Smad4 condujo a la aparición de tumores, se observó

como la delección Smad4 provocó una alteración en los mecanismos de reparación del ADN, lo que resultó en una situación de inestabilidad genética que permitía la acumulación de alteraciones promotoras de la aparición de tumor. Igualmente, la delección de Smad4 provocó un incremento de la actividad inflamatoria a nivel local, con un infiltrado leucocitario en el estroma tanto del epitelio no tumoral como del tumor Smad4^{-/-}. Los niveles de citoquinas proinflamatorias en la mucosa Samd4^{+/+} eran muy escaso o indetectables, en tanto que aumentaron de forma significativa en las mucosas y tumores Smad4^{-/-}.

La cantidad total de TGF-β1 en los tumores Smad4^{-/-} fue significativamente superior a la de la mucosa adyacente, y los niveles de ésta superiores a los de la mucosa control, tal como aparece en la siguiente figura.

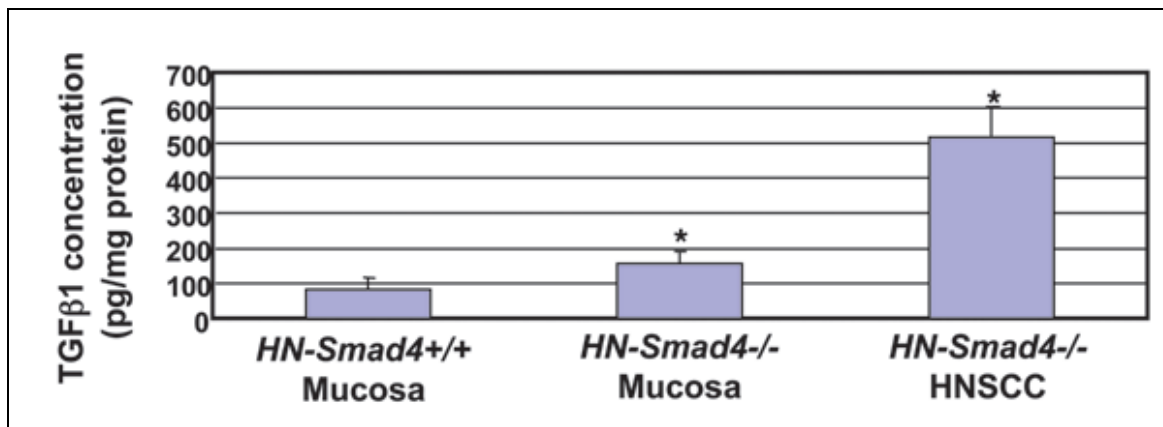


Figura 10. Niveles de TGF-β1

La delección de Smad4 condujo a una disminución de la forma fosforilada activa de Smad2, en tanto que se incrementó la tinción nuclear frente a Smad3 y Smad1/5/8.

De los estudios previos realizados por los autores se evidenció que la delección del TGF-βRII no indujo de forma espontánea la aparición de tumores, requiriendo de la inducción de mutaciones a nivel del Ras. La aparición espontánea de mutaciones en Ras sería un hecho poco frecuente, pero aparecería en el contexto de la inestabilidad genética promovida por la delección de Smad4. Si bien ni la delección heterocigota de Smad4 ni la mutación aislada de K-ras contaron con la capacidad de inducir la aparición de tumores, los ratones con K-ras mutado/Smad4^{+/+} sufrieron la rápida aparición de carcinomas en el área de cabeza y cuello, indicando que en el contexto de otros cambios oncogénicos como los que puedan aparecer en los campos de

cancerización, la pérdida de un único alelo de Smad4 es suficiente para promover la cancerogénesis.

Otra vía de señalización relacionada con la del TGF- β 1 es la PTEN/PI3K/Akt/mTOR. La activación de la vía PI3K/Akt actúa suprimiendo la apoptosis y promoviendo la proliferación celular. La hiperactivación de esta vía se consigue mediante mutaciones o incremento de la actividad de activadores como las oncoproteínas Ras, o a partir de la inactivación de PTEN. El gen PTEN es un gen supresor de tumor que regula de forma negativa la vía PI3K/Akt. Los CECC cuentan con mutaciones a nivel de este gen hasta en un 15% de ocasiones, pérdidas de expresión hasta en un 30%, habiéndose descrito LOH del locus PTEN hasta en un 40% de casos.

Bian y cols¹⁰ evaluaron la interacción entre TGF- β y PTEN en el contexto del CECC. Pudieron comprobar a partir del estudio de líneas celulares y material histológico de pacientes con CECC que la pérdida de la función de TGF- β y PTEN era un acontecimiento frecuente. Un análisis inmunohistoquímico de 20 muestras de CECC mostraron una disminución de la expresión del TGF- β RI en un 50% de ocasiones, y de PTEN en un 80%. Los autores generaron un modelo experimental knock-out para TGF- β RI y PTEN a nivel de mucosas de cabeza y cuello. Los especímenes TGF- β RI^{-/-} con PTEN conservado, y los PTEN^{-/-} con TGF- β RI conservado desarrollaron carcinomas de cabeza y cuello tras un año de seguimiento en el 10% y 21% de ocasiones, respectivamente. Las formas mixtas TGF- β RI^{-/-}/PTEN^{-/-} contaron con la aparición de lesiones papilomatosas en cabeza y cuello a las 4 semanas, y a las 10 semanas el 100% de los especímenes habían desarrollado un carcinoma. Las características de estos tumores incluyeron la pérdida de la actividad TGF- β 1 mediada por Smad, pero con una elevación de la actividad TAK1 que justificó el incremento en la expresión de NF- κ B, y una sobreexpresión de p-Akt.

Los autores proponen un esquema de promoción de los CECC a partir de la alteración conjunta de las vías de señal TGF- β y PTEN/PI3K/Akt.

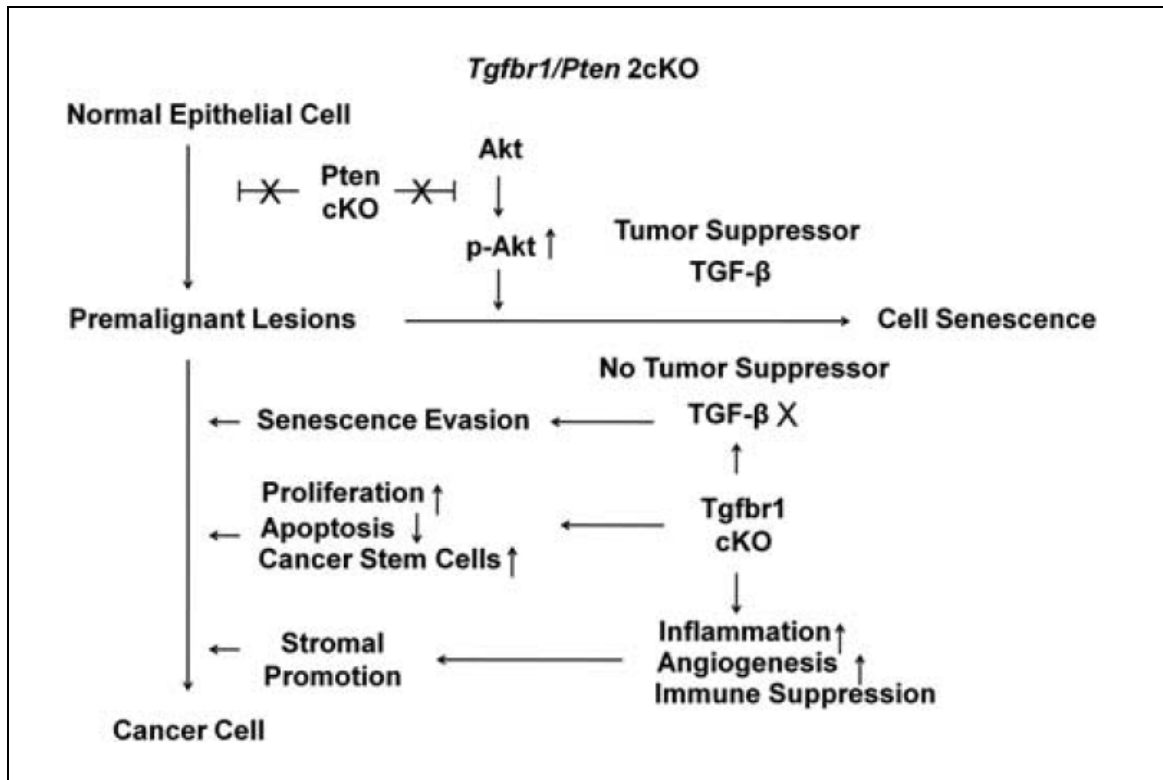


Figura 11. Promoción de los CECC a partir de la alteración conjunta de las vías de señal TGF-β y PTEN/PI3K/Akt.

La activación de la vía PI3K/Akt como consecuencia de la pérdida de la actividad PTEN iniciaría la formación de tumor a partir del incremento en la proliferación epitelial. Sin embargo, la delección PTEN exclusiva no sería suficiente para inducir la aparición de tumores debido a la inducción de una senescencia celular prematura mediatizada por Akt en presencia de la actividad supresora de tumor dependiente de una vía TGF-β funcional. La pérdida adicional de TGF-βRI resultaría en una desaparición de la inhibición ejercida por el TGF-β. Las células premalignas no alcanzarían la senescencia, progresando hacia células tumorales a través de diferentes mecanismos, incluyendo el incremento de la proliferación, la inhibición de la apoptosis, la evasión de la senescencia, y la sobreproducción de stem cell epiteliales. El decremento de la actividad TGF-β canónica incrementaría además la respuesta inflamatoria, la angiogénesis y la inmunosupresión a partir de la activación del NF-κB, y el incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias a nivel y el reclutamiento de células mieloides inmunosupresoras a nivel del microambiente tumoral.

La actividad TGF- β se ha relacionado con el mecanismo de transición epitelial-mesenquimal por parte de las células tumorales, pero también jugaría un papel fundamental en la activación de elementos celulares del microambiente tumoral. El TGF- β aparece como un elemento clave en la activación de los fibroblastos del estroma hacia fibroblastos activados, que cuentan con unas modificaciones fenotípicas que los hacen compatibles con la de los miofibroblastos. Vered y cols¹¹ constataron que la presencia de miofibroblastos en lesiones premalignas de la cavidad oral (incluyendo casos de hiperplasia y displasia leve, moderada y severa) fue muy escasa, de alrededor del 1%, en tanto que se incrementó de forma significativa en el caso de los carcinomas de cavidad oral, alcanzando en promedio el 14% ($P < 0.001$).

Los autores llevaron a cabo además una determinación inmunohistoquímica de la expresión del TGF- β , que apareció positivo en el 95% de los carcinomas (63% con un patrón focal y en 32% con un patrón difuso), especialmente a nivel de las áreas de infiltración tumoral. Existió una tendencia a presentar una mayor abundancia de miofibroblastos en las áreas con mayor expresión de TGF- β . Finalmente, con la finalidad de estudiar el proceso de la transición epitelial-mesenquimal por parte de las células tumorales, los autores desarrollaron una doble tinción inmunohistoquímica con antígenos de membrana y α -actina. En un 41% de los tumores estudiados aparecieron células co-expresando ambas tinciones, apareciendo una tendencia según la cual a nivel del frente de infiltración las células tumorales perdían de forma progresiva la tinción correspondiente a los antígenos de membrana, ocasionalmente adoptando una apariencia mesenquimal, y en estas áreas es donde aparecía la co-expresión con el marcador mesenquimal.

A este nivel de la interfase tumor-conectivo, algunas de las células miofibroblásticas adoptaban una apariencia epiteloide, mientras que células tumorales obraban una morfología fusiforme, fibroblastoide, haciendo ambigua la diferenciación entre los fenotipos epitelial y mesenquimal, tal como aparece en la siguiente imagen.

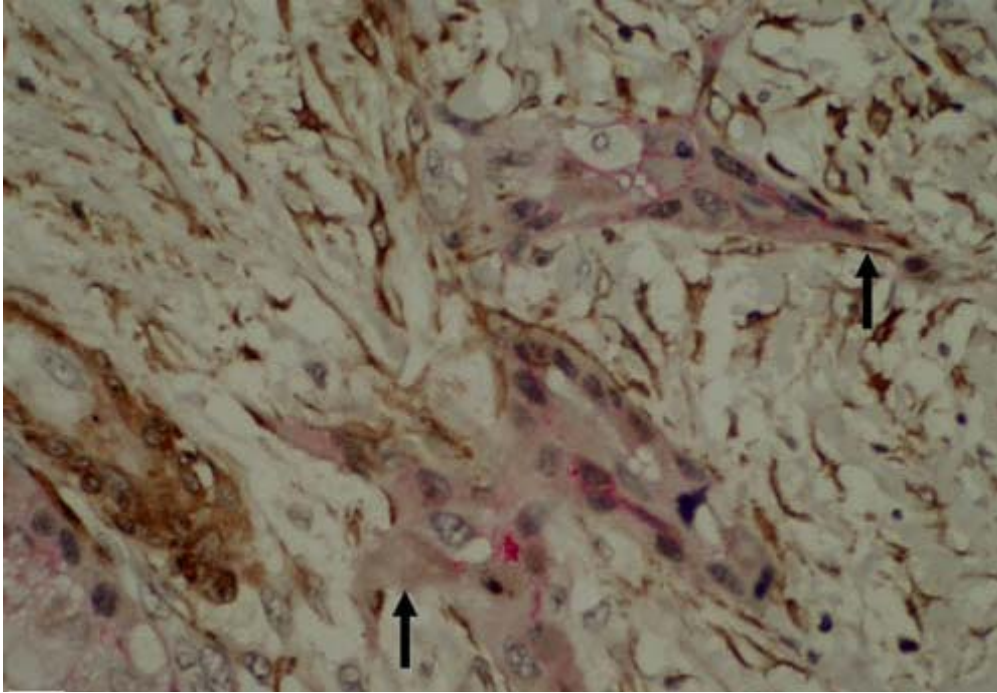


Figura 12. Diferenciación entre los fenotipos epitelial y mesenquimal. Antígeno epitelial de membrana en rojo, α -actina en marrón.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existen diferencias en el control local de la enfermedad en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia en relación con la expresión determinadas citoquinas.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente estudio es averiguar qué relación existe entre la expresión del TGF- β en muestras del tumor y el control local de la enfermedad, en los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue realizado a partir de material de biopsia obtenido de pacientes diagnosticados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona. Los criterios de inclusión correspondientes a los pacientes incluidos en el presente estudio fueron:

- Contar con un carcinoma escamoso localizado a nivel de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe diagnosticado en el periodo 2004-2008.
- Ausencia de antecedentes previos de lesiones tumorales a nivel de cabeza y cuello.
- Posibilidad de obtención de una muestra de biopsia del tumor, con confirmación histológica de que se trataba de un carcinoma escamoso.
- Haber seguido tratamiento con intención radical con radioterapia o quimioradioterapia y contar con un seguimiento mínimo de 12 meses.

En 37 ocasiones se obtuvo además una muestra de mucosa sana de una localización alejada a la correspondiente al tumor primario.

La realización del presente estudio fue aprobada por el Comité de Ensayos y de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital de Sant Pau.

Los datos correspondientes a las características epidemiológicas, de tratamiento y seguimiento de los pacientes se extrajeron de forma retrospectiva de una base de datos que, de forma prospectiva, recoge la información relevante de todos los pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona desde 1985¹².

En base a los criterios de inclusión, se evaluaron un total de 117 pacientes con un tumor índice de cabeza y cuello para los cuales se dispuso de las muestras biológicas correspondientes.

Se trataba de 104 paciente varones (88.9%) y 13 mujeres (11.1%). La siguiente tabla muestra la distribución de los pacientes en función de la localización del tumor primario.

Localización	Frecuencia	Porcentaje (%)
Cavidad oral	10	8,5
Orofaringe	42	35.9
Hipofaringe	11	9.4
Laringe	54	46.2
Total	76	100,0

Tabla 1. Localización del tumor primario

Un porcentaje elevado de pacientes contaron con el antecedente de consumo de tóxicos como el alcohol y el tabaco. La siguiente tabla muestra la distribución de los pacientes en función de los niveles de consumo de dichas sustancias.

			ALCOHOL			Total
			No	< 80 gr/día	> 80 gr/día	No
T A B A C O	No		7	3	0	10
			6,0%	2,6%	0,0%	8,5%
	< 20 cig/día		6	9	3	18
			5,1%	7,7%	2,6%	15,4%
	> 20 cig/día		9	41	39	89
			7,7%	35,0%	33,3%	76,1%
Total			22	53	42	117
			18,8%	45,3%	35,9%	100,0%

Tabla 2. Consumo de tóxicos

Un 6.0% de los pacientes no contaron con el antecedente en el consumo de tóxicos, un 15.4% reconocían un consumo moderado (<20 cig/día y < 80 gr de alcohol/día), en tanto que el 78.6% restante contaron con el antecedente de un consumo severo de alcohol y/o tabaco.

El grado histológico del tumor aparece en la siguiente tabla, que demuestra un predominio de los tumores considerados como moderadamente diferenciados, tal como ocurre de forma habitual en estas localizaciones de cabeza y cuello.

Grado histológico	Frecuencia	Porcentaje (%)
Bien diferenciado	8	6,8
Moderadamente diferenciado	97	82,9
Mal diferenciado	12	10,2
Total	117	100,0

Tabla 3. Grado histológico del tumor

La siguiente tabla muestra la distribución en función de la categoría de extensión local (T) y regional (N) de los pacientes en el momento del diagnóstico de acuerdo a los criterios establecidos por la 6ª edición de la clasificación TNM¹³.

		N				Total
		0	1	2	3	0
T	1	13	0	0	0	13
		11,1%	0%	0%	0%	11,1%
	2	28	8	10	1	47
		23,9%	6,8%	8,5%	0,9%	40,2%
	3	21	8	9	1	39
		17,9%	6,8%	7,7%	0,9%	33,3%
	4	5	3	8	2	18
		4,3%	2,6%	6,8%	1,7%	15,4%
Total		67	19	27	4	117
		57,3%	16,2%	23,1%	3,4%	100,0%

Tabla 4. Distribución en función del TNM

Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio contaba con la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico del tumor.

De acuerdo con la distribución de las categorías de extensión local y regional, los pacientes contaron los siguientes estadios.

Estadio	Frecuencia	Porcentaje (%)
1	13	11.1
2	28	24.0
3	37	31.6
4	39	33.3
Total	117	100.0

Tabla 5. Distribución en función del estadio

Un menor porcentaje de pacientes se agruparon en el estadio I, en tanto que el resto se distribuyó de manera bastante homogénea en el resto de los estadios.

De los pacientes incluidos en el estudio, 32 (27.4%) iniciaron la secuencia terapéutica con un tratamiento neoadyuvante de quimioterapia. La quimioterapia de inducción consistió habitualmente en 3 ciclos de cisplatino y 5-FU (25 casos) o cisplatino, 5-fluoruracilo y docetaxel (7 casos).

El tratamiento con intención radical consistió en la administración de radioterapia (n=66) o quimio-radioterapia (n=51). La técnica de tratamiento con radioterapia no se modificó de forma sustancial durante el periodo de estudio. El tratamiento consistió en la administración de radioterapia externa utilizando 2 o 3 campos conformados. Un total de 56 pacientes (73%) recibieron radioterapia con un fraccionamiento convencional (2 Gy/día) hasta completar una dosis de 70-72 Gy, en tanto que 21 pacientes (27%) fueron tratados en régimen de hiperfraccionamiento (1.2 Gy/ 2 veces al día) hasta completar una dosis de 72-74 Gy. Con la excepción de los pacientes con tumores T1 de glotis, la radioterapia incluyó el tratamiento de las áreas ganglionares. En caso de tratamiento concomitante con quimioterapia, la mayoría de pacientes recibieron cisplatino a dosis de 100 mg/m² administrados cada 3 semanas. En 7 ocasiones el tratamiento concomitante con la radioterapia consistió en la administración de Erbitux®.

La siguiente tabla muestra el tipo de tratamiento realizado en función de la categoría de extensión local de la enfermedad para los pacientes incluidos en el presente estudio:

	T				Total
	1	2	3	4	
RT	13 11,1%	28 23,9%	10 8,5%	1 0,9%	52 44,4%
QT-RT	0 0,0%	14 12,0%	10 8,5%	9 7,7%	33 28,2%
QT + RT	0 0,0%	2 1,7%	11 9,4%	1 0,9%	14 12,0%
QT + QT-RT	0 0,0%	3 2,6%	8 6,8%	7 6,0%	18 15,4%
Total	13 11,1%	47 40,2%	39 33,3%	18 15,4%	117 100,0%

Tabla 6. Tipo de tratamiento en función de la extensión local del tumor

Existieron diferencias significativas en el tipo de tratamiento realizado en función de la categoría de extensión local de la enfermedad, Los pacientes con tumores más avanzados tendieron a realizar tratamiento con quimio-radioterapia concomitante (Fisher's exact test, $P=0.0001$).

La secuencia terapéutica incluyó la realización de vaciamientos cervicales en 20 pacientes (17.1%). Salvo en un caso, la totalidad de cirugías realizadas a nivel cervical se realizaron una vez completado el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Hasta el momento del cierre del estudio, un total de 28 pacientes (23.9%) sufrieron una recidiva del tumor a nivel local como localización exclusiva del fracaso terapéutico, 8 pacientes (6.8%) una recidiva ganglionar exclusiva, y 9 pacientes (7.7%) una recidiva conjunta local y regional. Diez

pacientes (8.5%) contaron con la aparición de metástasis a distancia, en 4 ocasiones como la única localización de fracaso terapéutico.

La siguiente figura muestra la curva de supervivencia actuarial ajustada para los pacientes incluidos en el estudio.

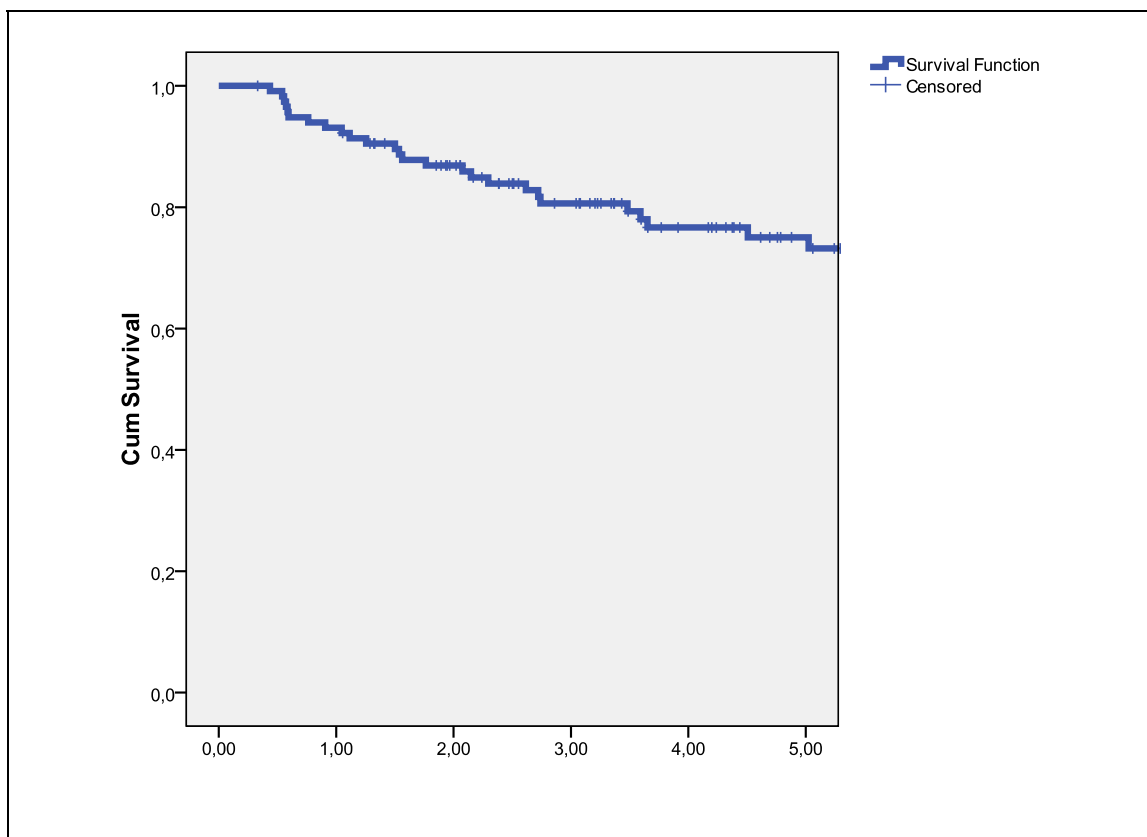


Figura 13. Curva de supervivencia actuarial ajustada

La supervivencia ajustada a los 5 años fue del 73.2% (IC 95%: 1.96*4.7).

A partir de las muestras se llevó a cabo la determinación de los niveles de expresión del gen TGF- β tanto en las muestras de tumor como en las correspondientes a mucosa sana.

Tras la obtención de las muestras se procedió a su inclusión en viales con 1 ml de solución RNALater® (Applied Biosystems) para evitar la degradación del ARN. Las biopsias se mantuvieron a continuación a 4°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se eliminó el RNALater® y se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

De forma simultánea a la obtención de las muestras utilizadas en el presente estudio, se procedió a la obtención de biopsias correspondientes a tejido tumoral que fueron enviadas al departamento de Anatomía Patológica, confirmándose en la totalidad de las ocasiones que se trataba de carcinomas escamosos.

Se describe a continuación la secuencia utilizada para determinar la expresión de los genes evaluados en el presente estudio.

1. Aislamiento del ARN con TRIzol.

Material:	<ul style="list-style-type: none">- TRIzol Reagent® (Invitrogen)- Cloroformo- Isopropanol- Etanol al 75% en agua- Agua libre de RNAsa
------------------	---

1.1. Homogeneización. En primer lugar se añadió TRIzol® a las muestras de tejido a razón de 1ml de TRIzol® por cada 50-100 mg de tejido y se procedió a su homogeneización. Una vez homogeneizado el tejido, se procedió a eliminar el material insoluble centrifugando a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. Se transfirió el ARN presente en el sobrenadante a otro tubo para proseguir con la extracción del ARN.

1.2. Extracción del ARN. Para proceder a la extracción del ARN, en primer lugar se procedió a la incubación de las muestras durante 5 min a 15-30°C para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. A continuación se añadieron 2 ml de cloroformo por ml de TRIzol®, se facilitó su combinación con la muestra, y se incubó de nuevo a 15-30°C durante 2-3 min. Se centrifugó la muestra a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación se forman dos fases: una fase inferior fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El ARN se encuentra exclusivamente en la fase acuosa. El volumen de la fase

acuosa es aproximadamente el 60% del volumen de TRIzol® usado para la homogenización.

Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó el ARN con la adición de isopropanol añadiendo 0.5 ml de isopropanol por ml de TRIzol® e incubando a 15.-30°C durante 10 min. De nuevo se centrifugó a 12.000 xg a 4°C. EL ARN precipitado, no visible de forma previa al centrifugado, forma entonces un pellet en el fondo del tubo utilizado en la preparación. Se extrajo en sobrenadante, y se lavó el pellet (x2) con 1 ml de etanol al 75%. Al final del proceso se procedió al secado del pellet de ARN al aire durante 5-10 min, y se disolvió en agua libre de ARNsas, conservando la muestra a -80°C.

1.3. Determinación de la concentración y pureza del ARN. La concentración y pureza del ARN en disolución se determinó mediante espectrometría. Se analizó la absorbancia a 260 (A260), que permite calcular la concentración del ARN, y a 280 (A280), que permite calcular su pureza.

Los ácidos nucleicos tienen el máximo de absorción a 260 nm, por lo tanto a esta longitud de onda la absorción es proporcional a la concentración. La concentración del ARN se calculó utilizando el coeficiente de extinción del ARN. La A260 de una solución de ARN a la concentración de 40 µg/ml cuando la luz pasa por un camino óptico de un cm es 1, por lo tanto la concentración de ARN en µg/ml se calculó multiplicando la A260 por 40.

Los ácidos nucleicos durante la extracción van acompañados de proteínas que absorben a 280 nm. La relación de absorbancias 260/280 nm indica la pureza y en el caso del ARN debe ser ≥ 2.0 .

2. Cuantificación de la expresión del ARN mediante RT-PCR.

La RT-PCR es una técnica que permite la determinación de la expresión de un gen determinado. Se basa en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante la reacción con transcriptasa inversa (transcripción

inversa, RT) y la posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El análisis de la expresión del ARNm de las distintas proteínas se realizó por PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-q-PCR). Esta técnica, al contrario a la detección a punto final de la RT-PCR convencional, permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación.

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por un fluorocromo excitado. En esta técnica se monitoriza la fluorescencia emitida durante la reacción de amplificación lo que representa la producción de amplicón durante cada ciclo.

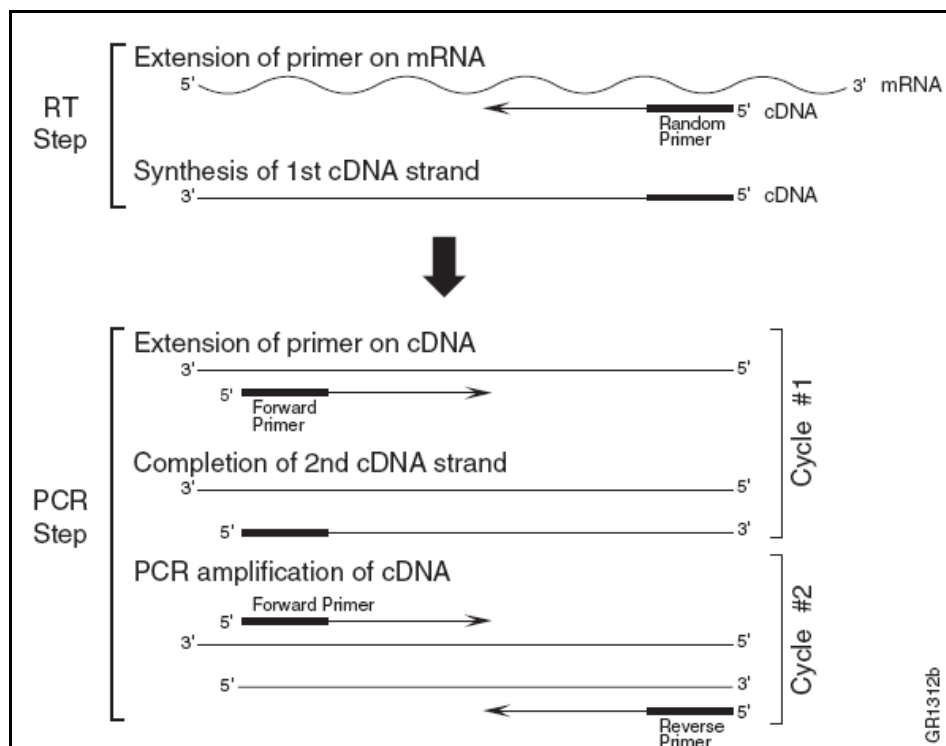


Figura 14. Técnica PCR.

2.1. Transcripción inversa.

Material:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®, Applied Biosystems

La transcripción inversa se realizó utilizando el KIT “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”. La transcriptasa inversa sintetiza una cadena de ADN complementaria (ADNc) a la molécula de ARN a partir de un cebador.

Este kit utiliza cebadores random para iniciar la síntesis de ADNc. Los cebadores random aseguran que la síntesis de la primera hebra ocurra eficientemente con todas las especies de ARN presentes.

El kit contiene los reactivos que combinados rinden una mezcla de reacción 2X. A ésta mezcla se le añade un volumen igual de ARN. Para preparar la mezcla de reacción 2X para un volumen de reacción de 20 µl:

Componente	Volumen (µl) por Reacción
Tampón de RT 10X	2.0
Mezcla de dNTP 25X (100mM)	0.8
Cebadores Random 10X	2.0
Transcriptasa Inversa	1.0
Inhibidor de RNAsas	1.0
H2O libre de Nucleasas	3.2
Total por Reacción	10.0

Tabla 7. Componentes de “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”

A cada 10 µl de mezcla de reacción se le añadió 1 µg de ARN disuelto en 10 µl de H2O y se procedió a la transcripción inversa en el termociclador. Las condiciones del ciclo para la retrotranscripción son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

Tabla 8. Condiciones del ciclo para la retrotranscripción.

Finalizada la reacción de retrotranscripción, se extrajeron las muestras del termociclador y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-q-PCR).

Material:

TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, Applied Biosystems

Gene Expression Assays®, Applied Biosystems

La PCR a tiempo real, igual que la PCR convencional, emplea un molde de ADNc, cebadores específicos (oligonucleótidos complementarios a una región determinada del ARN molde), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y ADN-polimerasa termoestable (Taq-polimerasa), pero además una sonda unida a un fluorocromo (FAM o VIC) que hibrida en el amplicón, la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse).

Como cebadores para el presente estudio se utilizaron los TaqMan® Gene Expression Assays, que son un conjunto de cebadores y sonda optimizados para RT-q-PCR formulados a una concentración 20X.

Cada ensayo contiene tres oligonucleótidos con dianas específicas:

- Un par de cebadores no marcados.
- Una sonda TaqMan® que en el extremo 5' está marcada fluorescente con FAM™ (o VIC®) y contiene una porción minor groove binder (MGB), que incrementa la temperatura de fusión de la sonda sin incrementar la longitud, lo que permite sondas más cortas, y en el extremo 3' contiene un amortiguador de fluorescencia no fluorescente (NFQ).

La RT-q-PCR usando TaqMan Gene Expression Assays se basa en la actividad 5' exonucleasa de la ADN-polimerasa:

- Las sondas TaqMan hibridan en el ADNc molde entre los dos cebadores no marcados. La señal fluorescente en el extremo 5' de la sonda es amortiguada por el NFQ del extremo 3' mediante transferencia de energía de resonancia (FRET, mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos).
- Durante la PCR, la Taq polimerasa alarga los cebadores no marcados usando el ADNc como molde. Cuando la polimerasa alcanza la sonda TaqMan la hidroliza por su actividad exonucleasa, lo que provoca la separación del fluorocromo del amortiguador y por

tanto la emisión de fluorescencia. El equipo detecta la fluorescencia emitida que está relacionada con la cantidad de amplicón producido.

- En cada ciclo de PCR se liberan moléculas de fluorocromo, resultando en un incremento de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado.

La TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, es una mezcla de los reactivos (excepto cebadores, sondas y molde) necesarios para realizar RT-q-PCR. La mezcla contiene la Taq-polimerasa, dNTPs, ROX™ que es un fluorocromo referencia interna que sirve para normalizar la señal del reportero durante el análisis para mejorar la precisión, (corrige las fluctuaciones causadas por cambios en concentración, volumen o efectos de la muestra) y tampones adecuados para la reacción.

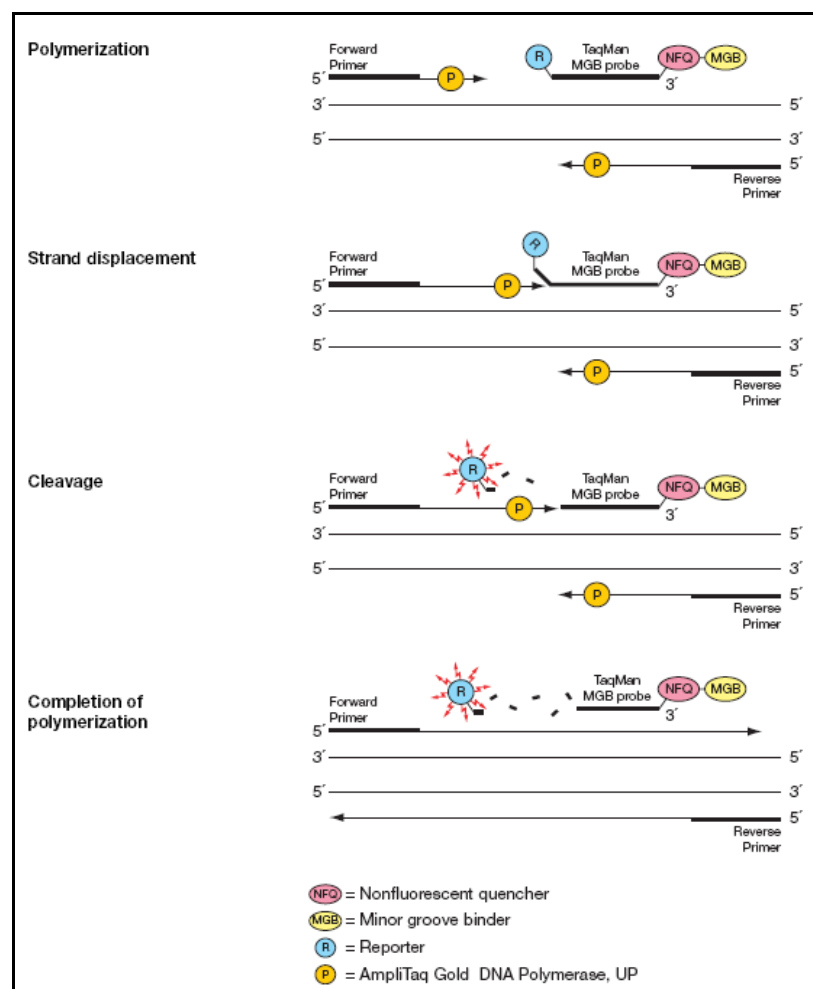


Figura 15. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Para preparar la reacción de un volumen de 10 µl:

Componente	Volumen (µl) por Reacción
20X TaqMan® Gene Expression Assays	0.5
<i>2X TaqMan Universal PCR Master Mix®</i>	5.0
ADNc diluido	4.5

Tabla 9. Componentes para la reacción RT-q-PCR

Las condiciones de ciclo fueron:

	Holding State	Holding State	Cycling State 40 cycles	
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	00:15 min	1 min
	Step 1	Step 1	Step 1	Step 2

Tabla 10. Condiciones del ciclo para RT-q-PCR

La curva de amplificación contiene la información para la cuantificación del ARN. La línea umbral (Thresold) es el nivel de detección o punto en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima del ruido de fondo. Se sitúa en la fase exponencial de la amplificación. El ciclo en el cual la muestra alcanza este nivel se llama ciclo umbral (Ct). Este valor es el que se utiliza para realizar la cuantificación.

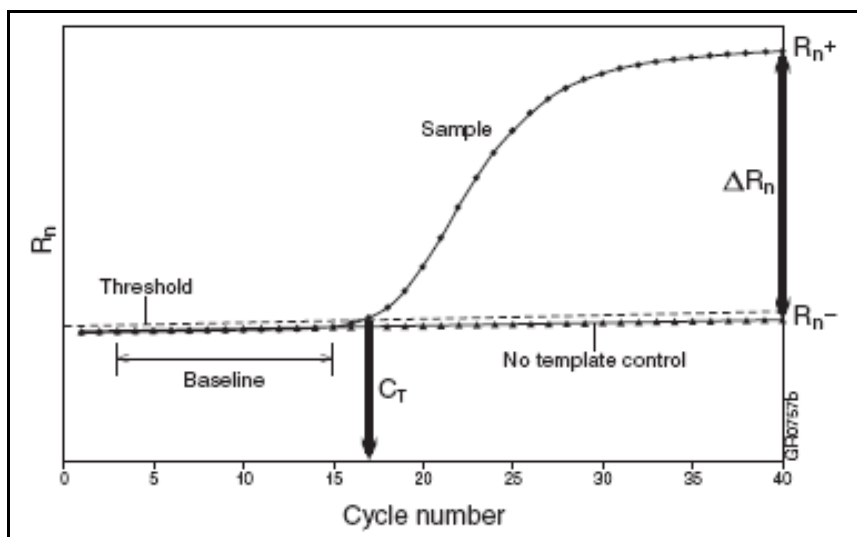


Figura 16. La curva de amplificación.

Se realizó una cuantificación relativa, que no requiere curva de calibrado. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar *versus* un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizador o, en inglés, *housekeeping gene*) que es considerado constante:

Se utilizó la fórmula:

$$2^{-\Delta C}$$

Donde ΔC se calcula:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ gen diana}} - C_{T \text{ gen referencia}}$$

Como gen de referencia se usó la beta-actina, de manera que los resultados obtenidos ofrecen la expresión relativa del gen diana respecto a la beta-actina.

TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows.

Análisis de la expresión del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello.

Se procedió en primer lugar a realizar un estudio descriptivo de los valores de expresión del TGF- β correspondientes al tejido tumoral y a la mucosa sana mediante estadísticos de tendencia central y el rango. Dado que la distribución de los valores de expresión del TGF- β no siguió una distribución normal (test de Kolmogorof-Smirnov $P=0.003$), se utilizaron técnicas no paramétricas en los estudios de comparación. Para la comparación de los niveles de expresión del NF- κ B entre el tejido tumoral y la mucosa sana se utilizó el test de Wilcoxon para medidas repetidas. La valoración de los niveles de expresión del TGF- β en el tumor en relación a las diferentes variables clínicas consideradas se llevó a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney en caso de variables dicotómicas, y el test de Kruskal-Wallis en el caso de variables con más de dos categorías.

Estudio de la capacidad pronóstica de la expresión del TGF- β .

En la evaluación del significado clínico de los valores de expresión del TGF- β , la categorización de la variable continua correspondiente al valor de expresión se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos con un análisis de partición recursiva, utilizando la técnica *de classification and regression trees* (CRT).

La supervivencia actuarial libre de recidiva local de la enfermedad y la supervivencia ajustada se calculó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, utilizando el test log-rank para la comparación entre las curvas de supervivencia. Para la realización de los análisis multivariantes se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

RESULTADOS

La siguiente gráfica muestra la distribución de los valores de expresión de TGF- β en tumor y mucosa sana para el grupo de 37 pacientes en los que se dispuso de una determinación de ambos valores. El tejido tumoral contó con un nivel de expresión de TGF- β superior al correspondiente a las mucosas sanas.

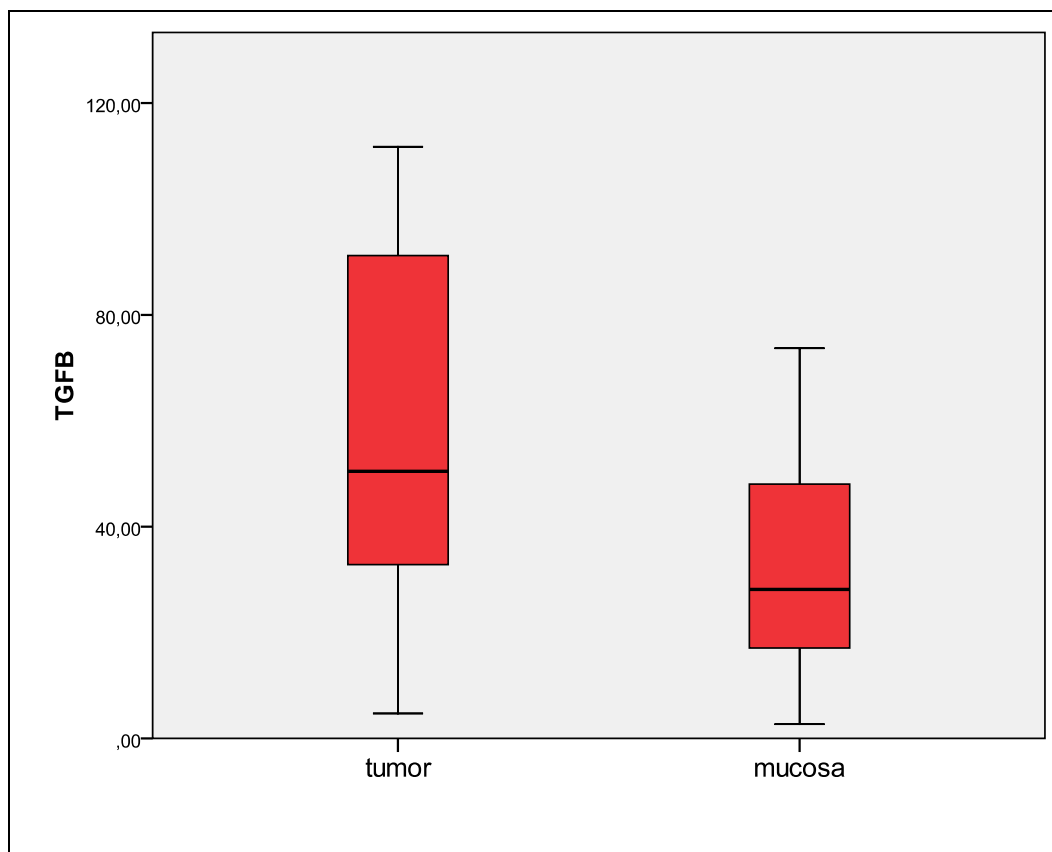


Figura 17. Valores de TGF- β en tumor y mucosa sana.

De acuerdo con la prueba no paramétrica de Wilcoxon, existieron diferencias significativas en los valores de TGF- β entre el tejido tumoral y la mucosa sana ($P=0.001$).

No existieron diferencias significativas entre los valores de expresión del TGF- β a nivel tumoral y la categoría de extensión local del tumor (T1-2 versus T3-T4, $P=0.057$), la categoría de extensión regional (No versus N+, $P=0.934$), la localización primaria del tumor (cavidad oral-orofaríngea versus laringe-hipofaríngea, $P=0.306$), o la diferenciación del tumor ($P=0.701$).

Se analizó a continuación la relación entre los niveles de expresión de TGF- β y el control local de la enfermedad mediante una técnica de partición recursiva.

Se obtuvo un modelo con 2 nodos terminales tal como aparece en la siguiente figura.

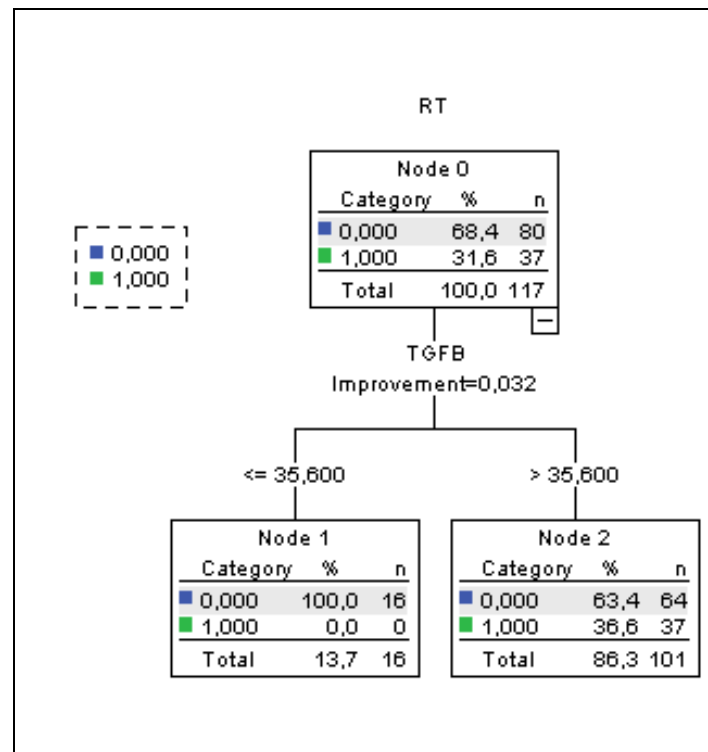


Figura 18. Relación entre los niveles de expresión de TGF- β y el control local de la enfermedad

El modelo estableció un punto de corte en el nivel de expresión del TGF- β significativo en relación con el control local de la enfermedad. De acuerdo con los resultados, el grupo de pacientes con unos niveles bajos de expresión del TGF- β ($n=16$, 13.7%) contaron con un control local de la enfermedad del 100%, en tanto que para el grupo de pacientes con unos niveles superiores al punto de corte ($n=101$, 86.3%), un 36.6% de los pacientes contaron con una recidiva del tumor a nivel local después de realizado el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Al analizar los resultados en función del tipo de tratamiento seguido por los pacientes, pudimos apreciar que la capacidad discriminativa del TGF- β dependía en gran medida de que los pacientes hubiesen recibido un

tratamiento inicial con quimioterapia de inducción de forma previa al tratamiento radical con radioterapia o quimio-radioterapia. Así, para los pacientes que no habían recibido un tratamiento inicial con quimioterapia de inducción (n=85), el TGF- β mantuvo su capacidad pronóstica, tal como muestra la siguiente figura resultante de evaluar este grupo de pacientes mediante la técnica de partición recursiva.

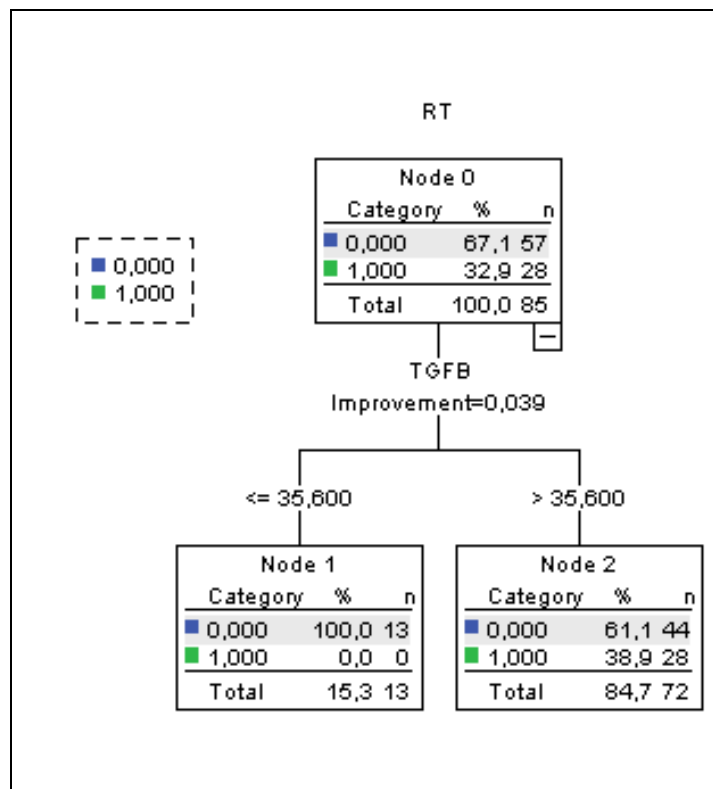


Figura 19. Relación entre los niveles de expresión de TGF- β y el control local de la enfermedad en pacientes que no recibieron QT de inducción.

Para este grupo de pacientes la supervivencia actuarial libre de recidiva local de enfermedad a los 5 años para el grupo de pacientes con unos niveles de expresión del TGF- β por debajo del punto de corte (n=13) fue del 100%, en tanto que para los pacientes con unos niveles situados por encima de este punto fue del 59.2% (IC 95%: 1.96*6.0). Existieron diferencias significativas en el control local de la enfermedad en función de los niveles de expresión del TGF- β (P=0.011), tal como aparece en la siguiente figura que muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local.

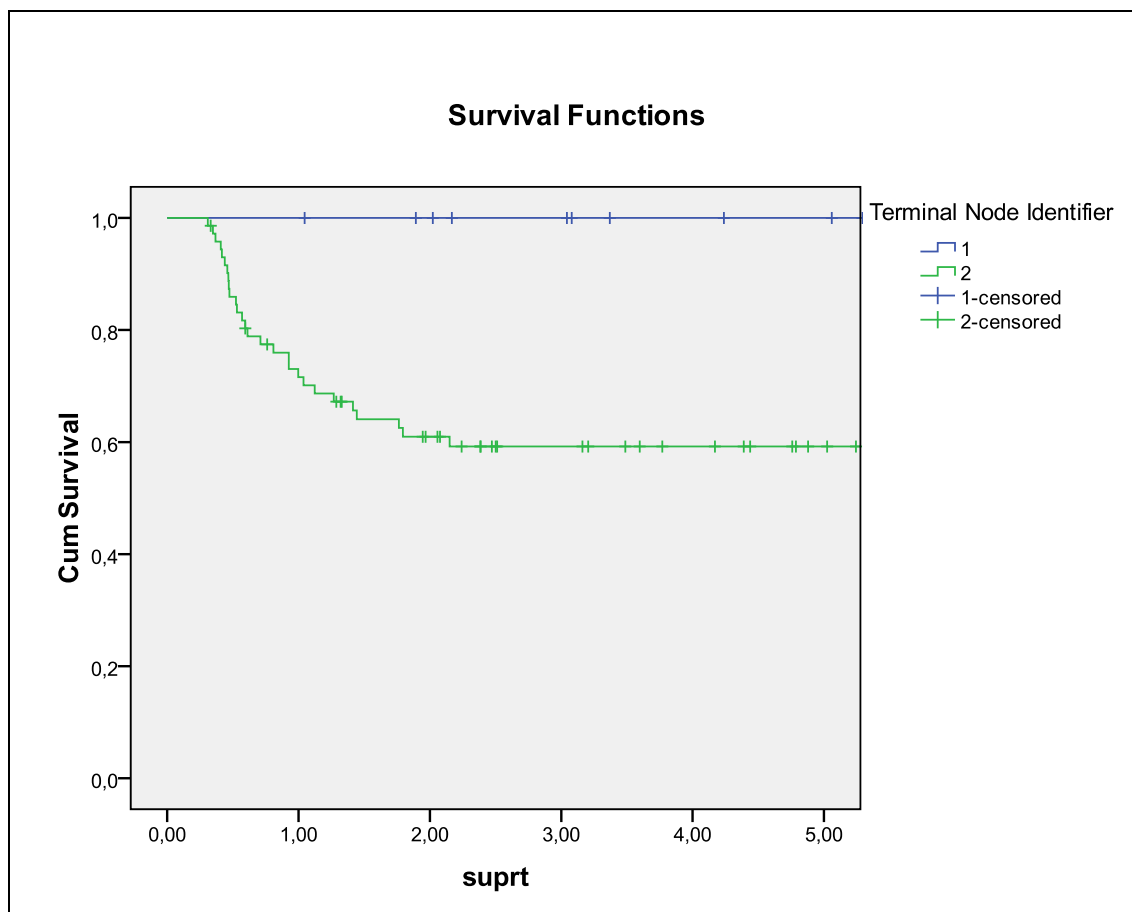


Figura 20. Curvas de supervivencia libres de recidiva local en pacientes que no recibieron QT de inducción.

Por el contrario, al considerar al grupo de pacientes que iniciaron el tratamiento con quimioterapia de inducción ($n=32$), se produjo una inversión en el sentido de la capacidad pronóstica del TGF- β . AL considerar este grupo de pacientes, el modelo de partición recursiva definió un punto de corte con capacidad de discriminar el control local de la enfermedad. De acuerdo con los resultados del modelo, los pacientes de este grupo con unos valores de expresión superiores al punto de corte ($n=16$) presentaron un porcentaje de recidivas a nivel local del 43.8%, en tanto que los pacientes con valores situados por debajo del punto de corte ($n=16$) tuvieron unos porcentajes de recidiva local del 12.5%, tal como aparece en la siguiente figura.

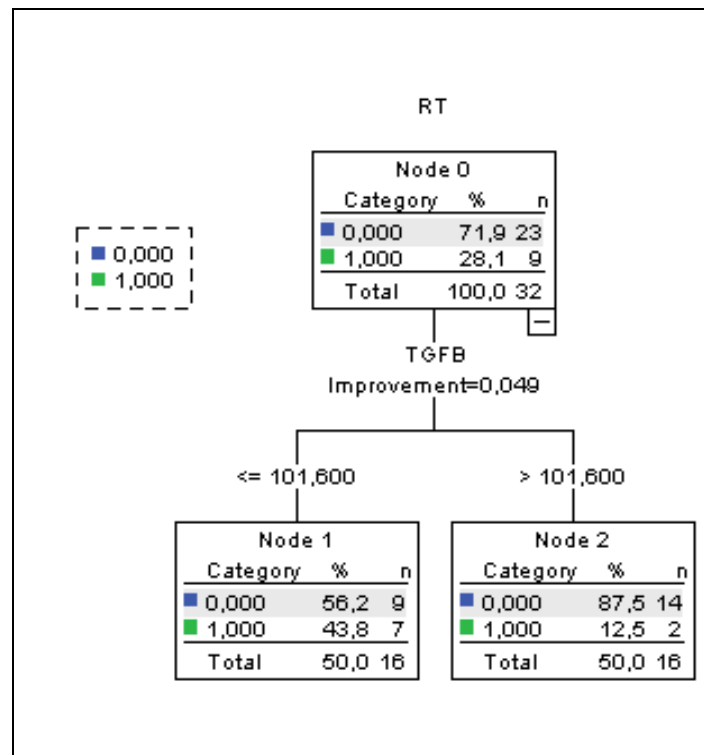


Figura 21. Relación entre los niveles de expresión de TGF-β y el control local de la enfermedad en pacientes que recibieron QT de inducción.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local de enfermedad en función de los niveles de expresión del TGF-β para los pacientes que iniciaron el tratamiento con quimioterapia de inducción.

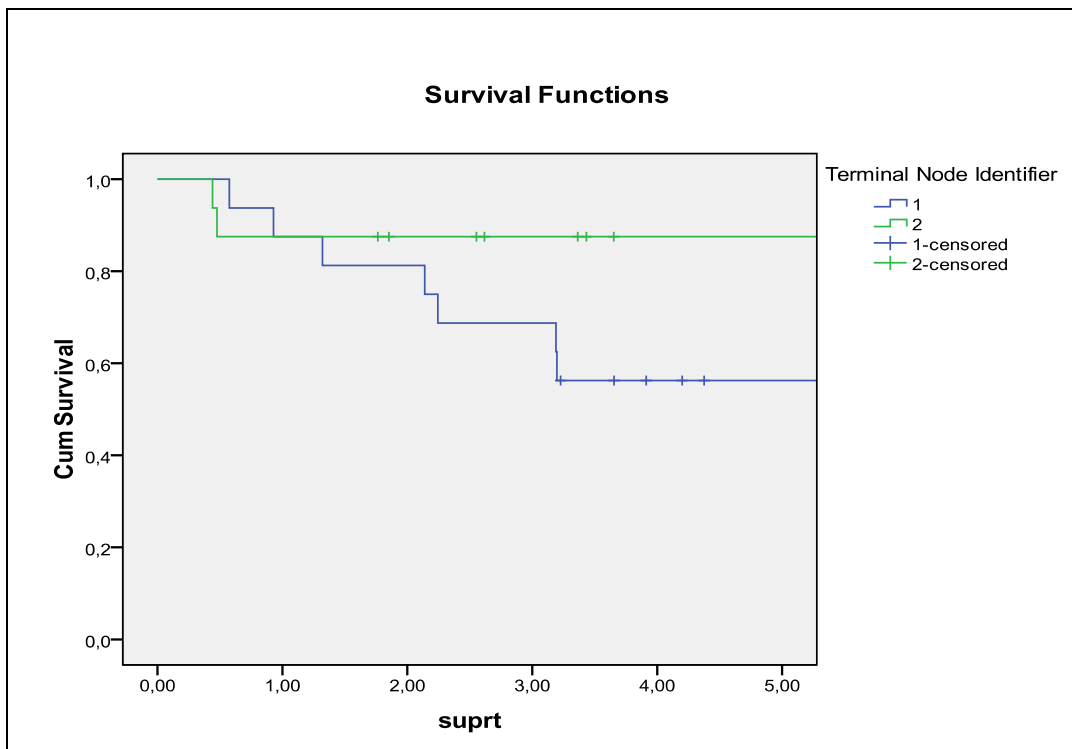


Figura 22. Curvas de supervivencia libres de recidiva local en pacientes que recibieron QT de inducción.

Si bien en este caso las diferencias entre las curvas de supervivencia no alcanzaron la significación estadística ($P=0.111$), puede observarse como el control local de la enfermedad fue superior para aquel grupo de pacientes que contaron con unos niveles de expresión más elevados de TGF- β .

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestros resultados, existe una relación entre la expresión del TGF- β y el control local de la enfermedad para los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia. Pudimos constatar además, que dicha capacidad pronóstica era dependiente de la existencia de que el paciente contase con el antecedente de un tratamiento con quimioterapia de inducción. Para los pacientes tratados con radioterapia o quimio-radioterapia sin quimioterapia previa, apareció una relación significativa entre la expresión del TGF- β y el control local, de manera que el grupo de pacientes con unos niveles de expresión bajos ($n=13$, 15%) mantuvieron un control local de la enfermedad en la totalidad de las ocasiones, en tanto que para los pacientes con unos niveles de expresión elevados ($n=72$, 85%), el control local cayó al 61.1%. La supervivencia libre de recidiva local de enfermedad a los 5 años correspondientes a estas cifras de control local fueron del 100% para los pacientes con unos niveles de expresión del TGF- β bajos, y del 59.2% para los que contaron con unos niveles elevados. Existieron diferencias significativas en relación al control local de la enfermedad en función de los niveles de expresión del TGF- β ($P=0.011$).

Sin embargo, al analizar el grupo de pacientes que iniciaron un tratamiento con quimioterapia de inducción, la capacidad pronóstica del TGF- β se invirtió, de manera que, si bien sin alcanzar unas diferencias significativas desde un punto de vista estadístico, el control local de la enfermedad para los pacientes con unos niveles de expresión bajos ($n=16$, 50%), que fue del 56.2%, fue inferior al correspondiente al grupo de pacientes con unos niveles de expresión elevados ($n=16$, 50%), que alcanzaron el 87.5%.

Es escasa la información existente en la literatura sobre la capacidad pronóstica de la expresión de la vía del TGF- β en pacientes con CECC, sin que aparezcan datos que relacionen dicha expresión con el control de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia o quimio-radioterapia.

En un estudio inmunohistoquímico desarrollado en 170 pacientes con CECC, Xie y cols¹⁴ encontraron una ausencia de expresión del Smad2 y Smad4 del 14% y 22% respectivamente. En una ampliación ulterior de este estudio, Xie y cols¹⁵ analizaron la expresión de Smad2, Smad 3 y Smad4 en 774 muestras de tumor obtenidas de 346 pacientes con CECC tratados de forma quirúrgica. Un 51% de las muestras mostraron un patrón de expresión y activación de las proteínas Smad conservado, en tanto que el 49% restante contaron con algún defecto en la señalización de la vía. Las siguientes figuras muestran los porcentajes de positividad de las formas inactivas (Smad2/3/4) y fosforiladas (pSmad2/3).

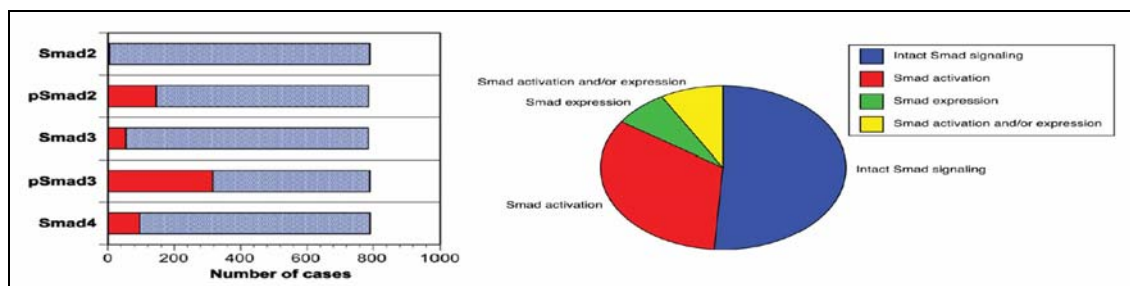


Figura 23. Porcentajes de positividad de las formas inactivas (Smad2/3/4) y fosforiladas (pSmad2/3).

No se apreciaron relaciones significativas entre los patrones de expresión de Smad y variables clínicas como sexo, raza, edad, antecedentes en el uso de tabaco, localización del tumor primario, estadio, grado histológico o afectación ganglionar.

Los pacientes que contaron con defectos en la activación de pSmad2/pSmad3 contaron con una peor supervivencia, en tanto que la expresión de Smad4 no contó con significado pronóstico.

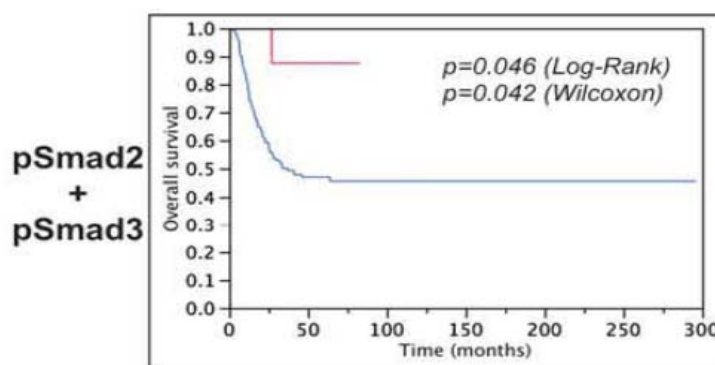


Figura 24. Curva de supervivencia en pacientes con defectos en la activación de pSmad2/pSmad3

De acuerdo con los autores, la ausencia de expresión de alguna de las proteínas Smad es poco frecuente. Por el contrario, la pérdida de expresión de las formas fosforiladas es un hallazgo más habitual. Esta pérdida selectiva de las formas activadas de las proteínas R-Smad serían una consecuencia de la inactivación funcional de los receptores TGF- β . En CECC, Xie y cols¹⁴ comunicaron la de pérdida de expresión de TGF- β RI en un 30% y de TGF- β RII en un 50% de los casos.

De acuerdo con Liu y cols¹⁶, en ausencia de señalización a través de la vía canónica como consecuencia de la inactivación de Smad4, TGF- β 1 activa Smad1 y Smad5, que jugarían un papel determinante en la el fenotipo invasivo e inflamatorio observado en los tumores Smad4^{-/-}.

En un estudio en que se evaluaron polimorfismos del TGF- β 1 en pacientes con CECC sometidos a diferentes tipos de tratamiento, Lundberg y cols¹⁷ encontraron una relación significativa entre el tipo de polimorfismo y la supervivencia para el grupo de pacientes tratados con quimio-radioterapia (n=38), en tanto que para los pacientes tratados con radioterapia (n=16), o cirugía (n=120) el genotipo no influyó de forma significativa en el pronóstico de la enfermedad. En el grupo tratado con quimioradioterapia, los genotipos CC y CT, que de acuerdo con diferentes estudios contaría con un incremento en la secreción y unos niveles séricos más elevados de TGF- β 1, tuvieron una mejor supervivencia que la correspondiente al genotipo salvaje TT.

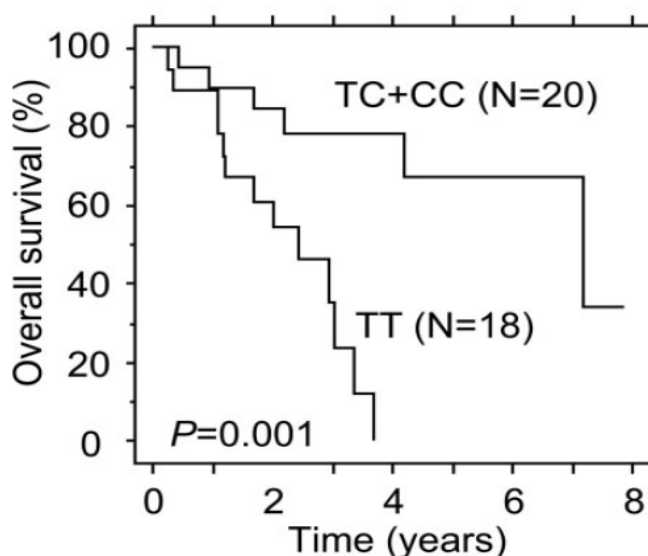


Figura 25. Curva de supervivencia según el polimorfismo del TGF- β 1

De acuerdo con los autores, el incremento en los niveles de TGF- β 1 se relacionaría con un mejor pronóstico de la enfermedad. Debe tenerse en cuenta que los autores llevaron a cabo la determinación del polimorfismo a partir de el genotipado de sangre periférica, sin que se efectuase ningún tipo de evaluación correspondiente a los niveles reales de expresión del TGF- β 1 a nivel del tumor.

En un estudio posterior desarrollado por el mismo grupo, pudo comprobarse como la capacidad pronóstica del genotipo del TGF- β 1 para los pacientes tratados con quimio-radioterapia se mantuvo como un factor pronóstico independiente de la expresión por parte del tumor de la p16, evaluada mediante técnicas de inmunohistoquímica¹⁸.

Por su parte, Logullo y cols¹⁹ realizaron un estudio inmunohistoquímico en 140 pacientes con CECC tratados con cirugía. De acuerdo con sus resultados, apareció positividad frente al TGF- β 1 en el 37.1% de los tumores (25.7% focal y 11.4% difusa), en tanto que en la mucosa adyacente macroscópicamente normal contó con positividad en la totalidad de las ocasiones. Se evaluó la positividad inmunohistoquímica de los receptores en 20 muestras de tumor (17 positivas frente a TGF- β 1 y 3 negativas), apareciendo una positividad marcada frente a TGF- β RII en la totalidad de las muestras positivas frente a TGF- β 1 y en 2/3 de las negativas, y frente a TGF- β RI en 9/17 muestras positivas frente a TGF- β 1. No aparecieron relaciones significativas entre la expresión del TGF- β 1 y variables clínicas como la localización del tumor, el estadiaje, o la presencia de metástasis ganglionares, en tanto que la frecuencia de positividad tendió a disminuir progresivamente con la indiferenciación histológica. Tampoco se apreció una asociación entre la expresión del TGF- β 1 y la supervivencia.

Günaydin y cols²⁰ llevaron a cabo un estudio comparando los niveles plasmáticos de TGF- β , IL-12 y IL-10 entre un grupo de 50 pacientes con un carcinoma escamoso de la laringe y 15 controles no tumorales. De acuerdo a los resultados obtenidos, no existieron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de las citoquinas estudiadas entre los pacientes tumorales y los

controles. No existió una asociación significativa entre los niveles del TGF- β 1 en los pacientes tumorales y la existencia de afectación regional o el estadiaje. En otro estudio se valoró la evolución de los niveles plasmáticos del TGF- β 1 durante el curso de tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia en pacientes con un CECC avanzado²¹. No apareció una asociación significativa entre los niveles plasmáticos iniciales del TGF- β 1 y la carga tumoral o la respuesta al tratamiento. Los autores encontraron una disminución significativa en los niveles plasmáticos del TGF- β 1 tras completar el tratamiento con quimioradioterapia (n=16, P=0.008), pero no así en el caso de los pacientes tratados con radioterapia (n=13, P=0.07).

En definitiva, la expresión del TGF- β parece ser una variable con capacidad pronóstica en relación al control local de la enfermedad en pacientes con CECC. Un incremento de la expresión de dicha citoquina estaría relacionado con un incremento en la radioresistencia, dato compatible con el conocimiento pre-clínico que relaciona la actividad de la vía TGF- β en los tumores epiteliales con la inducción de los mecanismos de transición epitelial-mesenquimal, que condicionarían un comportamiento fenotípico de resistencia al tratamiento con radioterapia.

CONCLUSIÓN

La expresión del gen del TGF- β se relaciona con el pronóstico de los pacientes con CECC tratados con radioterapia o quimio-radioterapia. Los pacientes con unos niveles de expresión elevados de dicha citoquina contaron con un control local de la enfermedad significativamente inferior al que tuvieron los pacientes con unos niveles de expresión bajos.

Bibliografía

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
2. Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW, Jr., Chatterjee SK. Tumor metastasis in an orthotopic murine model of head and neck cancer: possible role of TGF-beta 1 secreted by the tumor cells. *J Cell Biochem*. 2006 Apr 1;97(5):1036-51.
3. Pring M, Prime S, Parkinson EK, Paterson I. Dysregulated TGF-beta1-induced Smad signalling occurs as a result of defects in multiple components of the TGF-beta signalling pathway in human head and neck carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2006 May;28(5):1279-85.
4. Cohen J, Chen Z, Lu SL, Yang XP, Arun P, Ehsanian R, et al. Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes nuclear factor-kappaB activation in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69(8):3415-24.
5. Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz-Martin M, et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res*. 2004 Jul 1;64(13):4405-10.
6. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J, Munoz-Antonia T. Expression of transforming growth factor beta type II receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1243-8.
7. Lu SL, Herrington H, Reh D, Weber S, Bornstein S, Wang D, et al. Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev*. 2006 May 15;20(10):1331-42.
8. Bornstein S, White R, Malkoski S, Oka M, Han G, Cleaver T, et al. Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J Clin Invest*. 2009 Nov;119(11):3408-19.

9. Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, et al. Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3397-403.
10. Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, Chen W, Gutkind JS, et al. Loss of TGF-beta signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. *Oncogene.* 2012 Jul 12;31(28):3322-32.
11. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. *Cancer Microenviron.* 2009 Dec;2(1):49-57.
12. Leon X, Orus C, Quer M. [Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002 Mar;53(3):185-90.
13. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM : classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
14. Xie W, Bharathy S, Kim D, Haffty BG, Rimm DL, Reiss M. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res.* 2003;14(2):61-73.
15. Xie W, Aisner S, Baredes S, Sreepada G, Shah R, Reiss M. Alterations of Smad expression and activation in defining 2 subtypes of human head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012 Jan 24.
16. Liu IM, Schilling SH, Knouse KA, Choy L, Derynck R, Wang XF. TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *EMBO J.* 2009 Jan 21;28(2):88-98.
17. Lundberg M, Pajusto M, Koskinen WJ, Makitie AA, Aaltonen LM, Mattila PS. Association between transforming growth factor beta1 genetic polymorphism and response to chemoradiotherapy in head and neck squamous cell cancer. *Head Neck.* 2009 May;31(5):664-72.

18. Lundberg M, Leivo I, Saarilahti K, Makitie AA, Mattila PS. Transforming growth factor beta 1 genotype and p16 as prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2012 Jun 5.
19. Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2003 Mar;32(3):139-45.
20. Gunaydin RO, Kesikli SA, Kansu E, Hosai AS. Identification of the peripheral blood levels of interleukin-12, interleukin-10, and transforming growth factor-beta in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012 Mar;34(3):393-7.
21. Feltl D, Zavadova E, Pala M, Hozak P. The dynamics of plasma transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) level during radiotherapy with or without simultaneous chemotherapy in advanced head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2005 Feb;41(2):208-13.